

Identifikation und Modulation von Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Claudia Stolz
geboren in Grimma

Datum der Abgabe: Dezember 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden an der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mainz (11/2005-03/2008) und der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen (04-11/2008) durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Schuler
 2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers
 3. Gutachter: Prof. Dr. Erich Gulbins
- Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hardy Pfan

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2009

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ZUSAMMENFASSUNG.....	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1 EINLEITUNG.....	13
1.1 Pathogenese und Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen.....	13
1.1.1 B-Zell-Reifung	13
1.1.2 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	14
1.1.3 Molekulare Ursachen der Entstehung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen ..	15
1.1.4 Immunochemotherapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen	17
1.2 Rituximab-Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen	18
1.2.1 Antikörpertherapien	18
1.2.2 Struktur und Funktion von CD20	19
1.2.3 Direkte und indirekte Wirkmechanismen von Rituximab.....	20
1.3 Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab-Therapie.....	22
1.3.1 Molekulare Ursachen für die Rituximab-Resistenz	22
1.3.2 Intrinsischer Signalweg der apoptotischen Caspasenaktivierung	23
1.3.3 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg	25
1.3.4 Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Signalweg.....	27
1.4 Hypothesen und Zielsetzung	28
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Chemikalien	29
2.1.3 Farbstoffe	30
2.1.4 Stammlösungen und Puffer	31
2.1.5 Längenstandard	33
2.1.6 Medien und Zusätze	33
2.1.7 Enzyme	34
2.1.8 Inhibitoren	34
2.1.9 Fertigsysteme	34
2.1.10 Zelllinien	35
2.1.11 Plasmide	35
2.1.12 Oligonukleotide	36
2.1.13 Antikörper	37

2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Nukleinsäureanalytik.....	38
2.2.1.1	Isolierung von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen.....	38
2.2.1.2	DNA-Fällung.....	39
2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	39
2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.2.1.5	Restriktionsanalyse.....	40
2.2.1.6	Agarosegelelektrophorese	40
2.2.1.7	Polymerasekettenreaktion	41
2.2.1.8	Sequenzierung	41
2.2.1.9	Quantitative <i>Real-time</i> -Polymerasekettenreaktion.....	41
2.2.1.10	Retrovirale Transduktion.....	43
2.2.2	Proteinanalytik	44
2.2.2.1	Gewinnung von Proteinextrakten.....	44
2.2.2.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.2.2.3	Western Blot.....	45
2.2.2.4	Enzymimmunoassay zum Nachweis von zytosolischem Cytochrom c	46
2.2.2.5	Immunhistochemie	47
2.2.2.6	Durchflusszytometrie	47
2.2.2.7	Enzymatischer Nachweis der Caspasenaktivität	49
2.2.3	Kultivierung und Behandlung der humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien <i>in vitro</i>	49
2.2.3.1	Kultivierung der Zelllinien.....	49
2.2.3.2	Behandlung der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit Rituximab <i>in vitro</i>	50
2.2.3.3	Analyse der Rituximab-induzierten antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität <i>in vitro</i>	50
2.2.3.4	Analyse der Rituximab-induzierten komplementvermittelten Zytotoxizität <i>in vitro</i>	51
2.2.4	Untersuchung der direkten Rituximab-Wirkung in einem humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Xenotransplantationsmodell <i>in vivo</i>	52
2.2.4.1	NOD/SCID-Mausmodell.....	52
2.2.4.2	Humanes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Xenotransplantationsmodell ...	52
2.2.4.3	Rituximab-Behandlung <i>in vivo</i>	53
2.2.5	Immunohistochemische Untersuchung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Patientenproben.....	54
3	ERGEBNISSE.....	55
3.1	Charakterisierung des Rituximab-induzierten Zelltodes in humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien <i>in vitro</i>.....	55
3.1.1	Vergleich des Rituximab-induzierten Zelltodes durch direkte und indirekte Wirkmechanismen.....	55
3.1.2	Charakterisierung des Rituximab-induzierten Apoptosesignalwegs.....	59
3.1.2.1	Rituximab-induzierte, apoptotische DNA-Fragmentierung.....	59
3.1.2.2	Rituximab-induzierte Caspasenaktivierung	60
3.1.2.3	Rituximab-induzierte Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma.....	62
3.1.2.4	Rituximab-induzierter Verlust des mitochondrialen Membranpotentials....	63
3.1.2.5	Proteinexpression der Bcl-2-Proteinfamilie in Rituximab-sensitiven und -resistenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien	66

3.1.2.6	Transkriptionelle und translationale Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie durch Rituximab	67
3.1.2.7	Induktion von Rituximab-Resistenz in sensitiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durch Bcl-x _L -Expression.....	70
3.1.3	Charakterisierung der Rituximab-induzierten intrazellulären Signaltransduktion	72
3.1.4	Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien <i>in vitro</i>	74
3.1.4.1	Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durch das BH3-Mimetikum ABT-737	74
3.1.4.2	Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durch pharmakologische Inhibition des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges.....	76
3.2	Charakterisierung der Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab <i>in vivo</i>	77
3.2.1	Etablierung eines humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Xenotransplantationsmodells in NOD/SCID-Mäusen	77
3.2.2	Rituximab-Behandlung der humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome in NOD/SCID-Mäusen	79
3.2.3	Induktion von Resistenz gegenüber Rituximab durch Bcl-x _L <i>in vivo</i>	81
3.2.4	Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome durch Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase <i>in vivo</i>	82
3.3	Expression von Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten.....	84
4	DISKUSSION.....	87
4.1	Direkte Rituximab-induzierte Wirkmechanismen.....	87
4.1.1	Rituximab-induzierte, intrazelluläre Signaltransduktion	87
4.1.2	Rituximab-induzierte Apoptose	91
4.2	Molekulare Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab.....	93
4.2.1	Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose	93
4.2.2	Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab-induzierter intrazellulärer Signaltransduktion.....	96
4.2.3	Vergleich mit bestehenden Theorien zur Rituximab-Resistenz	97
4.3	Ausblick.....	99
	LITERATURVERZEICHNIS	101
	DANKSAGUNG.....	122
	LEBENS LAUF.....	123
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	126

Zusammenfassung

B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) sind eine heterogene Gruppe klonaler hämatologischer Neoplasien, die aus peripheren B-Lymphozyten hervorgehen. Die heutige Standardtherapie ist eine Kombination von zytotoxischen Chemotherapeutika mit dem therapeutischen anti-CD20-Antikörper Rituximab (MabThera[®], Roche). Bisher gilt die Hypothese, dass die anti-tumoralen Wirkungen von Rituximab *in vivo* vor allem auf den indirekten, immunologischen Wirkmechanismen der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) und der komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) basieren. Über die direkten Wirkungen von Rituximab auf die intrazelluläre Signaltransduktion von B-NHL ist bisher nur wenig bekannt. Anhand von humanen B-NHL-Zelllinien, einem B-NHL-Xenotransplantationsmodell in immuninkompetenten NOD/SCID (*non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*)-Mäusen und primären Proben von B-NHL-Patienten wurde die Modulation der intrazellulären Signalwege von PI3K/Akt (*phosphoinositide-3 kinase*), MAPK (*mitogen-activated kinase*) und der Apoptosekaskade durch Rituximab *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Rituximab über den klassischen Signalweg der Caspasenaktivierung direkt intrinsische, „mitochondriale“ Apoptose induziert. Allerdings zeigte ein Teil der untersuchten B-NHL eine zellintrinsische, primäre Resistenz gegenüber Rituximab. Diese Resistenz basierte auf einer verstärkten Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Mcl-1 sowie auf einer konstitutiven Aktivierung der Serin/Threoninkinase Akt, die an der Regulation von Zellwachstum und an der Inhibition von Apoptose beteiligt ist. Durch therapeutische Modulation der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie mit dem BH3-Mimetikum ABT-737 oder der Inhibition der PI3K, einem essentiellen Aktivator von Akt, mit LY294002 konnten resistente B-NHL-Zelllinien gegenüber Rituximab *in vitro* und *in vivo* sensitiviert werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	Struktur des Immunglobulin G.....	14
Abbildung 1.2.	Schematische Darstellung des zellulären Ursprungs von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) im Keimzentrum von Lymphknoten oder der Milz	16
Abbildung 1.3	Vergleich des ereignisfreien Überlebens von B-NHL-Patienten, die mit konventioneller Chemotherapie (CHOP) oder auf Rituximab-basierter Immunochemotherapie (R-CHOP) behandelt wurden	17
Abbildung 1.4	A) Hypothetisches Modell der Struktur von CD20 innerhalb der Zellmembran, B) B-Zell-Rezeptor Signaltransduktion.....	20
Abbildung 1.5	Direkte (A) und indirekte (B) Wirkmechanismen von Rituximab.....	21
Abbildung 1.6	Extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg	24
Abbildung 1.7	Phosphoinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg	26
Abbildung 1.8	MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK	27
Abbildung 2.1	Rituximab-Behandlungsschema der mit humanen B-NHL-xenotransplantierten NOD/SCID-Mäusen.....	53
Abbildung 3.1	Rituximab-induzierter Zelltod.....	55
Abbildung 3.2	Direkte Apoptoseinduktion durch Rituximab.....	56
Abbildung 3.3	Vergleich der direkten Induktion von Apoptose durch Rituximab-Behandlung mit den indirekten Wirkmechanismen CDC und ADCC.....	57
Abbildung 3.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD20 auf der Zelloberfläche der B-NHL-Zelllinien	58
Abbildung 3.5	Vergleich der Induktion von intrinsischer, mitochondrialer Apoptose durch Rituximab mit dem Pan-Kinaseinhibitor Staurosporin.....	59
Abbildung 3.6	Caspasenaktivierung durch Rituximab in sensitiven und resistenten B-NHL-Zellen.....	60
Abbildung 3.7	Inhibition der apoptotischen DNA-Fragmentierung durch den Pan-Caspaseinhibitor zVAD (A) und Vergleich der Caspasenaktivierung in den B-NHL-Zelllinien (B).....	61
Abbildung 3.8	Rituximab- und Staurosporin-induzierte Cytochrom c-Freilassung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma.....	63

Abbildung 3.9	Durchflusszytometrischer Nachweis des Rituximab-induzierten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials Ψ_m mit TMRE-Färbung und Vergleich der Rituximab-sensitiven Ramos mit den resistenten Jeko-1.....	64
Abbildung 3.10	Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch Rituximab-Behandlung.....	65
Abbildung 3.11	Vergleich der Proteinexpression der pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in Rituximab-sensitiven und –resistenten B-NHL-Zellen mittels Western Blot.....	66
Abbildung 3.12	Vergleich der transkriptionellen Regulation der Bcl-2-Familie durch Rituximab-Behandlung in der sensitiven Zelllinie SU-DHL-4 und der resistenten Jeko-1 anhand der mRNA-Expression der Gene der Bcl-2-Familie.....	68
Abbildung 3.13	Vergleich der translationalen Regulation der Bcl-2-Familie durch Rituximab-Behandlung in sensitiven und resistenten B-NHL-Zellen.....	69
Abbildung 3.14	Induktion von Resistenz gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose in sensitiven B-NHL-Zellen mittels stabiler Überexpression von Apoptoseinhibitoren.....	71
Abbildung 3.15	Modulation des MAPK- und PI3K/Akt-Signalweges durch 4 h Behandlung mit monomerem und quervernetztem Rituximab in sensitiven und resistenten B-NHL-Zellen.....	73
Abbildung 3.16	Sensitivierung der Rituximab-resistenten B-NHL-Zellen Jeko-1, HT und Sc-1 gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose mithilfe der Kombination von Rituximab mit dem BH3-Mimetikum ABT-737.....	75
Abbildung 3.17	Sensitivierung der resistenten B-NHL-Zellen gegenüber Rituximab-Behandlung durch Inhibition des konstitutiv aktiven PI3K/Akt-Signalweges.....	76
Abbildung 3.18	Immunohistochemische Analyse des Knochenmarks, der Niere und der Lunge von NOD/SCID-Mäusen, die mit der humanen B-NHL-Zelllinie Ramos heterotransplantiert wurden.....	78
Abbildung 3.19	Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Heterotransplantation von Rituximab-sensitiven B-NHL Ramos in den NOD/SCID-Mäusen mit und ohne Behandlung mit Rituximab.....	82
Abbildung 3.20	IgG1-Isotypkontrolle (Cetuximab) der Behandlung der NOD/SCID-Mäuse, die mit den B-NHL-Zelllinien Ramos und HT heterotransplantiert wurden.....	79

Abbildung 3.21	Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Bcl-xL-exprimierende Ramos-Zellen xenotransplantiert in NOD/SCID-Mäusen mit Rituximab-Therapie im Vergleich zu unbehandelten Mäusen81
Abbildung 3.22	Kaplan-Meier-Überlebenskurven von NOD/SCID-Mäusen heterotransplantiert mit den Rituximab-resistenten B-NHL-Zellen HT und Sensitivierung durch Kombinationstherapie von Rituximab mit dem PI3K-Inhibitor LY294002.....83
Abbildung 3.23	Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression der anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Mcl-1 in Patienten mit indolenten oder aggressiven B-Zell-Lymphomen, die innerhalb einer Immunochemotherapie mit Rituximab behandelt wurden und sich nach der Therapie entweder in Remission befanden oder rezidierten.....85
Abbildung 3.24	Auswertung der immunhistologisch bestimmten Expression von pAkt(Ser473) im Vergleich zu Gesamt-Akt in Biopsien von Patienten mit aggressivem B-Zell-Lymphom.....85
Abbildung 3.25	Korrelation der Proteinexpression von Mcl-1 mit dem Phosphorylierungsgrad von Akt in Patienten mit aggressivem B-NHL, die nach der Immunochemotherapie mit Rituximab entweder rezidierten oder sich in Remission befinden.....86
Abbildung 4.1	Vergleich der Rituximab-induzierten Apoptose in den sensitiven (A) und resistenten (B) B-NHL-Zelllinien.....97
Abbildung 4.2	Sensitivierung Rituximab-resistenter B-NHL gegenüber der Rituximab-induzierten Apoptose durch die Kombination mit einem BH3-Mimetikum (ABT-737) oder einem PI3K-Inhibitor (LY294002).....99

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
Akt	Proteinkinase B
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APAF	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bad	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated x protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
Bcl-x _L	<i>B-cell leukemia/lymphoma x_L</i>
B-CLL	B-Zell-chronisch lymphatische Leukämie
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B-cell receptor</i>)
BH3	<i>Bcl-2 homolgy 3 domain</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BL	Burkitt-Lymphom
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides</i>
BLIMP1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
°C	Grad Celsius
CAD	<i>caspase activated DNase</i>
CaMKII	Calmodulin-Kinase II
Caspase	<i>cysteiny-l-aspartate specific protease</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementary determining region</i>
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
c-myc	<i>cellular, v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DD	<i>death domain</i>
DFF	DNA-Fragmentationsfaktor
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DLBCL	diffus großzelliges Lymphom (<i>diffuse large B-cell lymphom</i>)
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DR	<i>death receptor</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Elk-1	<i>ETS-related transcription factor</i>
ER	endoplasmatischen Retikulum
ERK1/2	<i>extracellular receptor kinase</i>
ETS	<i>erythroblast transformation specific</i>
Fab	Antigenbindestelle (<i>fragment antigen binding</i>)
FACS	Fluoreszenz-assoziierten Zellsorter (<i>fluorescent associated cell sorter</i>)
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas-Ligand (<i>death receptor ligand, CD95L</i>)
Fc	konstantes Antikörperfragment (<i>fragment constant</i>)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	follikuläres Lymphom
FLICE	FADD-like IL-1 β -converting enzyme
FLIP	<i>FLICE/caspase-8 inhibitory protein</i>
Flt3	<i>FMS proto-oncogene-like tyrosine kinase 3</i>
FoxO1	<i>Forkhead Box O1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase-3β</i>
h	Stunde
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen DR</i>
IgG	Immunglobulin G
IgH	schwere Immunglobulinkette (<i>immunoglobulin heavy chain</i>)
IgV	variablen Immunglobulinketten
IHC	Immunhistochemie
I κ B	Inhibitor von kappaB
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
i.v.	intravenös
JAK	Janus-Kinase
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MAC	Membranangriffskomplex (<i>membrane attack complex</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCL	Mantelzelllymphom (<i>mantle cell lymphom</i>)
Mcl-1	<i>myeloid cell leukaemia 1</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MEK1/2	<i>ERK activator kinase / mitogen-activated protein kinase kinases</i>
MFI	mediane Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescent intensity</i>)
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS4A	<i>membrane spanning 4A</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	nukleärer Faktor-kappaB (<i>nuclear factor-kappa B</i>)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	nanometer
nM	nanomolar
NOD/SCID	<i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
OD	optische Dichte (<i>optical density</i>)
PAK2	<i>p21-activated kinase 2</i>
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PHLPP	<i>PH domain leucin-rich repeat phosphatase</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC β	Proteinkinase C β
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
Prkdc	<i>protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
PU.1	<i>purine-rich box-1</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time</i> -PCR
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin/Hydroxydaunorubicin, Vincristin/Oncovin, Prednisolon
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RIP-1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
RKIP	<i>Raf kinase inhibitor protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
S6K	<i>p70 ribosomal S6 protein kinase</i>
SAHA	<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOC	<i>store-operated cation</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TMRE	Tetramethylrhodaminethylenester
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	<i>TNF-R1-associated death domain</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TSC2	<i>Tuberous Sclerosis 2</i>
VAD-FMK	Val-Ala-Asp-[O-methyl]-fluoromethyl-keton
V(D)J	Immunglobulingenfragmente (<i>variable, diversity, joining</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Pathogenese und Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

1.1.1 B-Zell-Reifung

B-Lymphozyten sind Leukozyten (weiße Blutzellen) und gehören zum adaptiven, humoralen Immunsystem. Dabei sind sie beispielsweise an der Abwehr von körperfremden Mikroorganismen beteiligt. Die Entwicklung von B-Lymphozyten findet im Knochenmark aus pluripotenten Blutstammzellen statt. Innerhalb des Pro- und Prä-B-Zellstadiums kommt es zu der V(D)J (*variable, diversity, joining, constant*)-Rekombination von Genabschnitten der schweren und leichten Immunglobulinketten (*IgH, heavy; IgL, light*) (Küppers und Dalla-Favera, 2001; Jung und Alt, 2004). Nach der erfolgreichen Rekombination exprimieren unreife B-Zellen membrangebundenes IgM (Immunglobulin M) als B-Zell-Rezeptor (BCR, *B-cell receptor*) auf ihrer Zelloberfläche. Durch alternatives Spleißen werden IgD-Rezeptoren ausgebildet. Die somit vollständig ausgereiften, naiven B-Lymphozyten verlassen das Knochenmark und zirkulieren im Blut oder in peripheren lymphatischen Organen, wie der Milz, Thymus, Lymphknoten oder Knochenmark.

Mithilfe der Antigenbindestelle (CDR, *complementary determining region*) innerhalb des Fab-Fragments (*fragment antigen binding*) des entsprechenden B-Zell-Rezeptors werden körperfremde Antigene erkannt (Abb. 1.1). Nach der Aktivierung durch Antigen-spezifische T-Helferzellen kommt es zur Ausbildung eines Keimzentrums im Lymphknoten oder der Milz. Dort findet Selektion, klonale Proliferation und Differenzierung der aktivierten B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen statt (Abb. 1.2). Bei der somatischen Hypermutation werden Punktmutationen in die für variable Immunglobulinketten (*IgV*)-kodierenden Genabschnitten eingeführt. Nach positiver und negativer Selektion produzieren diese B-Zellen BCR beziehungsweise Antikörper mit höherer Affinität zum Antigen (Allen et al., 2007; Rajewsky, 1996).

Des Weiteren kommt es während der Keimzentrumsreaktion zum Klassenwechsel, bei dem der konstante Teil der schweren Kette des Antikörpers (Fc, *fragment constant*) durch Rekombination ausgetauscht wird (Abb. 1.1). Dadurch ändert sich der Isotyp des Antikörpers von IgM zu IgG, IgA oder IgE, wodurch die immunologischen Effektorfunktionen verändert

werden. Das Fc-Fragment ist beispielsweise für die Opsonierung von Bakterien zur Phagozytose, für die Neutralisation von Toxinen sowie für die Aktivierung des Immunsystems verantwortlich (Allen et al., 2007; Klein und Dalla-Favera, 2008).

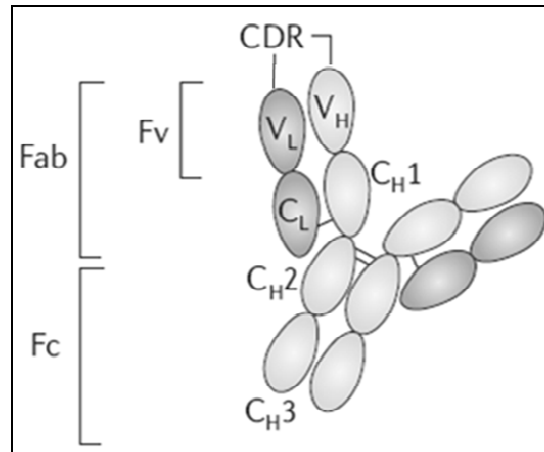


Abbildung 1.1 Struktur des Immunglobulin G. Das IgG-Molekül (ca. 150 kDa) besteht aus zwei leichten (L, *light*) (dunkelgrau) und zwei schweren (H, *heavy*) Ketten (hellgrau). Das Fab-Fragment enthält die variablen Teile (Fv, *fragment variable*) des Antikörpers mit den Antigenbindestellen (CDR, *complementary determining regions*). Das Fc-Fragment (*fragment constant*) ist der konstante Teil des Antikörpers, der für die immunologischen Wirkmechanismen verantwortlich ist. Alle Ketten des Antikörpers sind durch Disulfidbrücken verbunden und teilweise glykosyliert (Imai und Takaoka, 2006).

1.1.2 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) sind eine heterogene Gruppe klonaler, maligner hämatologischer Neoplasien, die aus peripheren B-Lymphozyten hervorgehen. Sie treten mit einer Inzidenz von 5 - 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr in Deutschland auf und zeigen eine gesteigerte Häufigkeit zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Die 5-Jahres-Überlebensrate von B-NHL-Patienten beträgt in Deutschland ca. 50 %, wobei diese durch den histologischen Subtyp determiniert ist (Deutsches Krebsregister, Robert-Koch-Institut). Abhängig vom Lymphomsubtyp manifestieren sie sich vor allem in Lymphknoten sowie in anderen lymphatischen Organen oder im Blut (leukämisch).

Die klinischen Symptome von B-NHL sind durch Lymphknotenschwellung, Leistungsminderung, Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß, Infektanfälligkeit und Blutveränderungen gekennzeichnet. Anhand operativ entfernter Lymphknoten oder Feinnadelbiopsien erfolgt die Diagnostik anhand morphologischer Kriterien und

Immunphänotypisierung. Die Einteilung in klinische Stadien wird mittels bildgebender Verfahren (Computertomographie, Röntgen, Sonographie) ermittelt sowie gegebenenfalls durch Knochenmarkbiopsie (Michl, 2005).

Die Klassifikation maligner Lymphome erfolgt nach zellmorphologischen, immunologischen und genetischen Merkmalen anhand der Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Harris et al., 1999; Jaffe et al., 2001). Das follikuläre Lymphom (FL) ist ein niedrigmalignes Lymphom mit indolentem Krankheitsverlauf, das nur in frühen Stadien kurativ therapierbar ist. Die chronisch lymphatische Leukämie (B-CLL) zählt auch zu den indolenten B-NHL, zeigt aber einen leukämischen Verlauf. Hochmaligne B-NHL, wie das diffus großzellige Lymphom (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphom*) oder das Burkitt-Lymphom, sind aggressiver, aber kurativ therapierbar. Die Anwendung von Genexpressionsanalysen erlaubt eine weitere Klassifikation der B-NHL-Subtypen und prognostische Aussagen über Krankheitsverlauf oder Therapieansprechen (Jais et al., 2008; Lenz et al., 2008).

1.1.3 Molekulare Ursachen der Entstehung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

Aufgrund von Fehlern während der V(D)J-Rekombination, dem Klassenwechsel oder der somatischen Hypermutation während der B-Zell-Reifung, Aktivierung oder Differenzierung kann es zu abweichenden chromosomalen Translokationen sowie zu Mutationen kommen, bei denen Onkogene, Tumorsuppressorgene oder Zellzyklusregulatoren betroffen sein können (Abb. 1.2).

Eine charakteristische chromosomale Translokationen für das follikuläre Lymphom ist die Translokation der Chromosomen 14 und 18 (t(14;18)), bei der das anti-apoptotische Gen *Bcl-2* (*B-cell-lymphoma 2*) unter Kontrolle des starken Promotors der schweren Immunglobulinkette dereguliert exprimiert wird. Charakteristisch für das Mantelzelllymphom (MCL, *mantle cell lymphom*) ist eine t(11;18) Translokation mit Überexpression des Zellzyklusregulators Cyclin D1. Das Burkitt-Lymphom und das DLBCL weisen beispielsweise eine Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Myc aufgrund einer t(8;14) Translokation auf, wodurch verschiedene proliferationsaktivierende Gene unter der Kontrolle von c-Myc dereguliert werden (Küppers et al., 1999; Küppers, 2005; Lenz et al., 2007; Pelengaris et al., 2002).

Weitere transformierende Ereignisse, wie z.B. die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, sind erforderlich, damit es zur malignen Entartung des jeweiligen B-Zell-Klons und zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen kommt. Bisher konnten in B-NHL Mutationen in den Genen für das Tumorsuppressorprotein p53, den Todesrezeptor CD95, den Transkriptionsfaktor Bcl-6, den Inhibitor von κ B (I κ BA) und BLIMP1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) identifiziert werden (Gaidano et al., 1991; Gronbaek et al., 1998; Pasqualucci et al., 1998; Müschen et al., 2000; Pasqualucci et al., 2006; Takahashi et al., 2006) (Abb. 1.2).

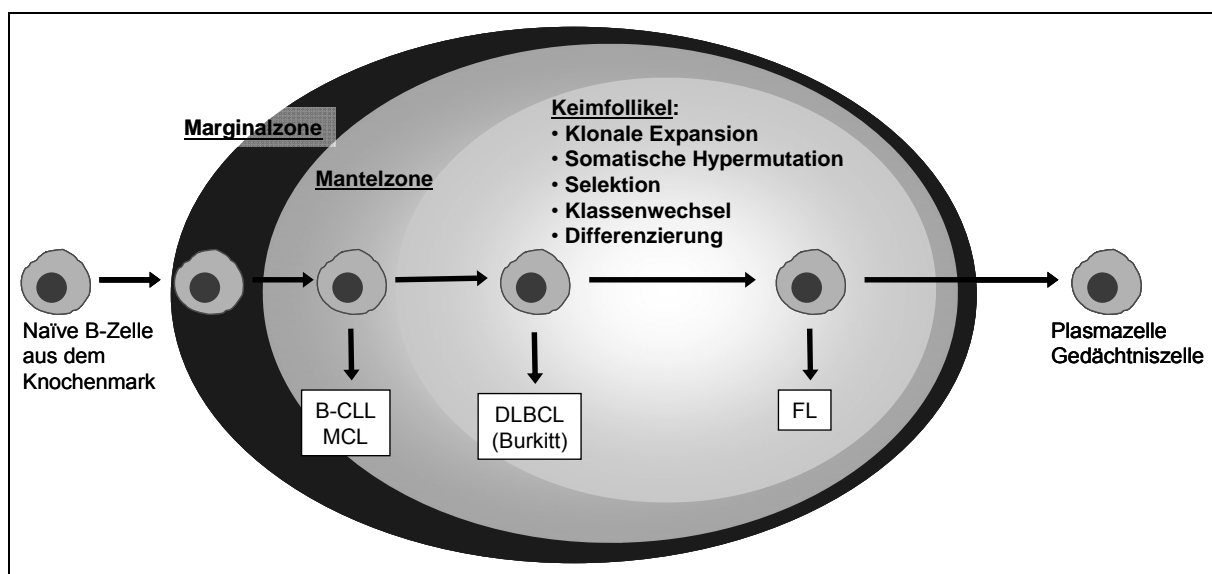


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des zellulären Ursprungs von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) im Keimzentrum von Lymphknoten oder Milz. Nach der Erkennung von Fremdanitgenen und der Aktivierung durch Antigen-spezifische T-Lymphozyten erfolgt die klonale Proliferation, Selektion und Differenzierung des jeweiligen B-Zell-Klons innerhalb der Keimzentrumsreaktion. Das Keimzentrum besteht aus drei Schichten, der Marginalzone (nur in der Milz vorhanden), der Mantelzone und dem Keimfollikel, die während der B-Zell-Differenzierung durchlaufen werden. Kommt es dabei zu Fehlern bei der somatischen Hypermutation oder Rekombination der Immunglobulinketten, können klonale, maligne transformierte B-Lymphozyten entstehen. Das resultierende B-Zell-Lymphom weist den jeweiligen Differenzierungsgrad und Phänotyp der Ursprungszelle auf (B-CLL – B-Zell-chronisch lymphatische Leukämie, MCL – Mantelzelllymphom, DLBCL – diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, FL – follikuläres Lymphom).

In den letzten Jahren konnten außerdem fehlerhaft regulierte, intrazelluläre Signalwege in B-NHL mithilfe genomweiter Untersuchungen identifiziert und funktionell bestätigt werden. Dazu gehören beispielsweise die Signalwege von NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) und der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die zu einem gesteigerten Zellwachstum und zu Therapieresistenz führen (Hömig-Hölzel et al., 2008; Kim et al., 2008; Lam et al., 2008; Leseux et al., 2006; Uddin et al., 2006).

1.1.4 Immunochemotherapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

Die Standardtherapie für Patienten mit fortgeschrittenen, reifen B-NHL ist eine Immunochemotherapie bestehend aus dem anti-CD20-Antikörper Rituximab und zytotoxischer Chemotherapeutika (R-CHOP-Schema: Cyclophosphamid, Doxorubicin/Hydroxydaunorubicin, Vincristin/Oncovin, Prednisolon). Aufgrund der chemosensitivierenden Wirkung von Rituximab wird durch diese Kombinationstherapie das Ansprechen der Patienten verbessert und das ereignisfreie sowie das Gesamtüberleben im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie verbessert (Abb. 1.3). Allerdings sprechen auch auf diese Therapie nur ca. 70 - 80 % der B-NHL-Patienten an. Das bedeutet, dass ein Teil der B-Zell-Lymphome eine primäre Resistenz gegenüber Rituximab-basierten Therapien aufweisen (Coiffier et al., 2002; Hiddemann et al., 2005; Pfreundschuh et al., 2006).

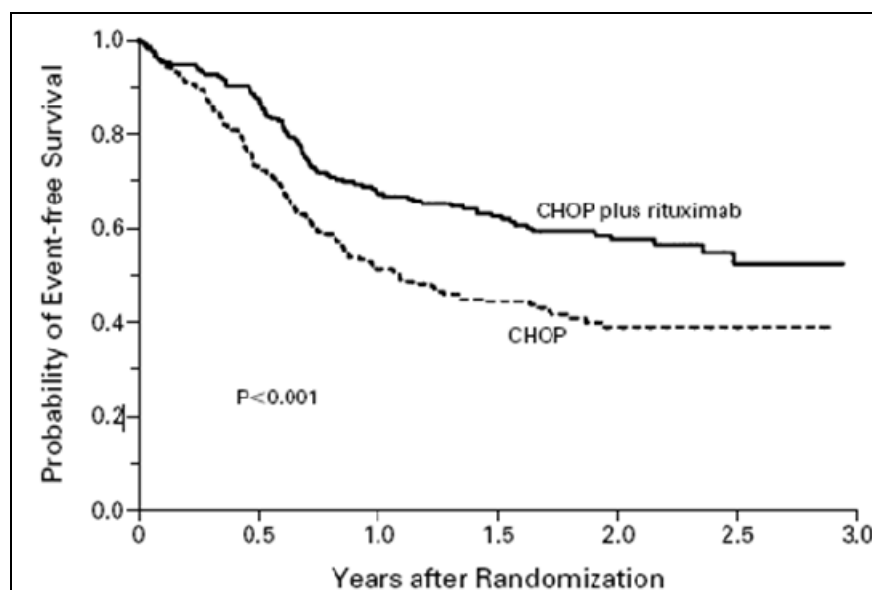


Abbildung 1.3 Vergleich des ereignisfreien Überlebens von B-NHL-Patienten, die mit konventioneller Chemotherapie (CHOP) oder mit Rituximab-basierter Immunochemotherapie (R-CHOP) behandelt wurden (Coiffier et al. 2002).

1.2 Rituximab-Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

1.2.1 Antikörpertherapien

Die zielgerichtete Tumorthherapie mit therapeutischen Antikörpern oder Proteinkinase-Inhibitoren ist im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie und Bestrahlung ein neuer, spezifischerer Ansatz, um vorrangig Tumorzellen im Patienten therapeutisch abzutöten (Imai und Takaoka, 2006). Therapeutische Antikörper erkennen antigenträgende Zellen und machen diese wieder für das Immunsystem „sichtbar“. Dabei erkennt das Fab-Fragment des Antikörpers mithilfe der CDR spezifisch das korrespondierende Antigen auf der Zelloberfläche und das Fc-Fragment des gebundenen Antikörpers aktiviert das Immunsystem (Abb. 1.1). Das Fc-Fragment wird beispielsweise von mononukleären Zellen mithilfe deren Fc-Rezeptoren oder von Komplementkomponenten erkannt (Abb. 1.5B).

Für therapeutische Antikörper wird vor allem die Antikörperklasse IgG1 (Immunglobulin G1) verwendet, da diese am stärksten das Komplementsystem oder Immuneffektorzellen aktivieren. IgG1-Antikörper besitzen ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa und bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten mit jeweils konstanter und variabler Region, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (Abb. 1.1).

Ideale Zielstrukturen auf Tumorzellen für die Antikörpertherapie sind Zelloberflächenproteine, die nicht internalisiert, verändert oder als lösliche Form von der Zelloberfläche abgelöst werden. 1986 wurde der erste therapeutische Antikörper, der murine anti-CD3 Antikörper Muromonab (Orthoclone OKT-3), von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zur immunsuppressiven Therapie bei Organtransplantationen zugelassen. 1997 folgte die Zulassung des ersten therapeutischen Antikörpers für die Behandlung von onkologischen Erkrankungen. Der chimäre anti-CD20 Antikörper Rituximab (MabThera®, Roche) wurde für die Therapie von CD20-positiven, refraktären B-NHL zugelassen (Cheson und Leonard, 2008; Maloney et al., 1997). Inzwischen erfolgt der Einsatz von Rituximab auch bei der Therapie von anderen B-Zell-bedingten Erkrankungen, wie z.B. der Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis.

1.2.2 Struktur und Funktion von CD20

Das Zielmolekül von Rituximab, der Pan-B-Zell-Marker CD20 (*cluster of differentiation 20*) wird nur auf unreifen, reifen und malignen B-Lymphozyten, nicht aber auf hämatopoietischen Stammzellen, Pro-B-Zellen oder Antikörper-produzierenden Plasmazellen exprimiert (Nadler et al., 1981; Stashenko et al., 1980). CD20 ist ein ideales Zielantigen für die Behandlung mit therapeutischen Antikörpern, da es von den B-NHL nicht sezerniert, internalisiert oder herunterreguliert wird.

Über die Struktur und Funktion des 37 kDa-großen Phosphoproteins ist bisher nur wenig bekannt. Auch Mäuse mit gezielter genetischer Ablation von CD20 zeigen einen weitgehend normalen Phänotyp (O'Keefe et al., 1998). CD20 gehört zu der Tetraspanin-Proteinfamilie MS4A (*membrane spanning 4A*), die oligomere Komplexe innerhalb der Zellmembran bilden (Abb. 1.4A) (Ishibashi et al., 2001).

Die gegenwärtige Hypothese zur Funktion von CD20 beschreibt eine Beteiligung an der B-Zell-Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung als extrazellulärer Calcium-Kanal bei der BCR-Signaltransduktion (Polyak und Deans, 2002; Tedder et al., 1989). Nach Bindung von Fremdanigen an den B-Zell-Rezeptor werden intrazelluläre Signalwege, wie z.B. Phospholipase-C γ 2 (PLC γ 2) und Proteinkinase-C β (PKC β) sowie die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ERK1/2 (*extracellular receptor kinase*) und JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*), aktiviert (Hsueh und Scheuermann, 2000; Kurosaki, 2002; Pierce, 2002). Daraufhin kommt es zum Ausströmen von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytoplasma und zusätzlich zum Einstromen von extrazellulärem Calcium durch Liganden-abhängige Calcium-Kanäle (SOC, *store-operated channel*) in der Zellmembran, zu denen auch CD20 gehören soll. Das zytoplasmatische Calcium aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege, wie z.B. die Calmodulin-Kinase II (CaMKII) oder die Proteinkinase C (Abb. 1.4B). Die erfolgreiche Antigenerkennung führt über die BCR-Signaltransduktion zur B-Zell-Aktivierung und klonalen Expansion (Petrie und Deans, 2002; Polyak et al., 2008; Scharenberg et al., 2007; Walshe et al., 2008). Fehlerhafte Antigenerkennung führt zum programmierten Zelltod (Apoptose) der jeweiligen B-Zelle.

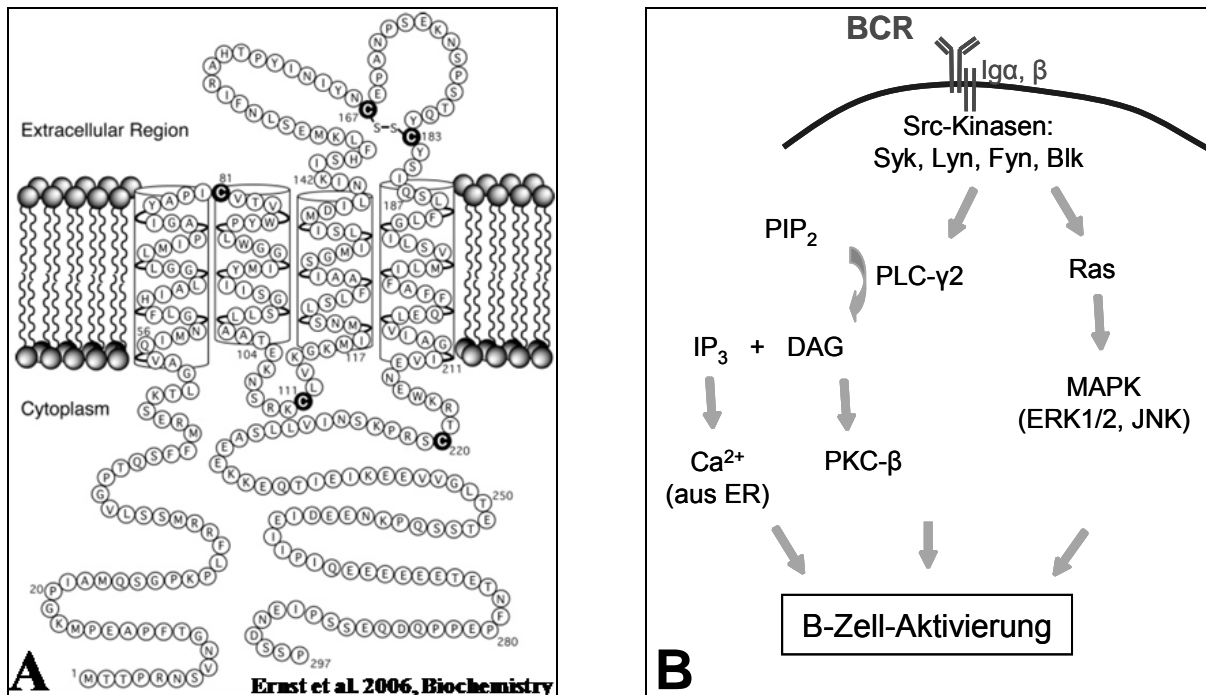


Abbildung 1.4 A) Hypothetisches Modell der Struktur von CD20 innerhalb der Zellmembran und B) B-Zell-Rezeptor Signaltransduktion. (A) Die Struktur des Pan-B-Zell-Markers CD20, basierend auf Vorhersagen anhand der cDNA Sequenz, besteht aus vier Transmembrandomänen, sowie einer kleinen extrazellulären Domäne und intrazellulärem N- und C-Terminus (Ernst et al., 2006). (B) Mithilfe des BCR-Komplexes bestehend aus membrangebundenem IgM oder IgD sowie assoziierten Igα/β-Molekülen, erkennen B-Zellen Fremdantigene. Über die intrazellulären Signalwege von Phospholipase Cγ2, Proteinkinase Cβ und MAPK werden B-Zellen aktiviert.

1.2.3 Direkte und indirekte Wirkmechanismen von Rituximab

Rituximab erkennt ein diskontinuierliches Epitop innerhalb der extrazellulären Domäne von CD20, welches von den Aminosäuren ¹⁷⁰ANPS¹⁷³ gebildet wird (Binder et al., 2006; Polyak und Deans, 2002) (Abb. 1.4A). Durch die Bindung von Rituximab an CD20 werden intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst sowie die B-NHL für das Immunsystem sichtbar gemacht.

Bisher bekannte, direkte Wirkmechanismen von Rituximab sind die Translokation von CD20 in cholesterinreiche Mikrodomänen der Zellmembran, die sogenannten *lipid rafts*, und daraufhin folgend eine Modulation der intrazellulären Signalwege von NF-κB, der MAPK ERK1/2 und p38 sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Dadurch soll es zur Hemmung der Proliferation, zur Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) und zur Chemosensitivierung der B-NHL-Zellen kommen (Abb. 1.5A) (Bezombes et al., 2004; Bonavida, 2007; Janas et al., 2005; Jazirehi et al., 2003; Jazirehi et al., 2004b; Jazirehi et al.,

2004a; Jazirehi et al., 2007; Suzuki et al., 2007; Tedder und Engel, 1994; Vega et al., 2004). Allerdings ist die Rituximab-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion und Apoptose noch nicht vollständig aufgeklärt.

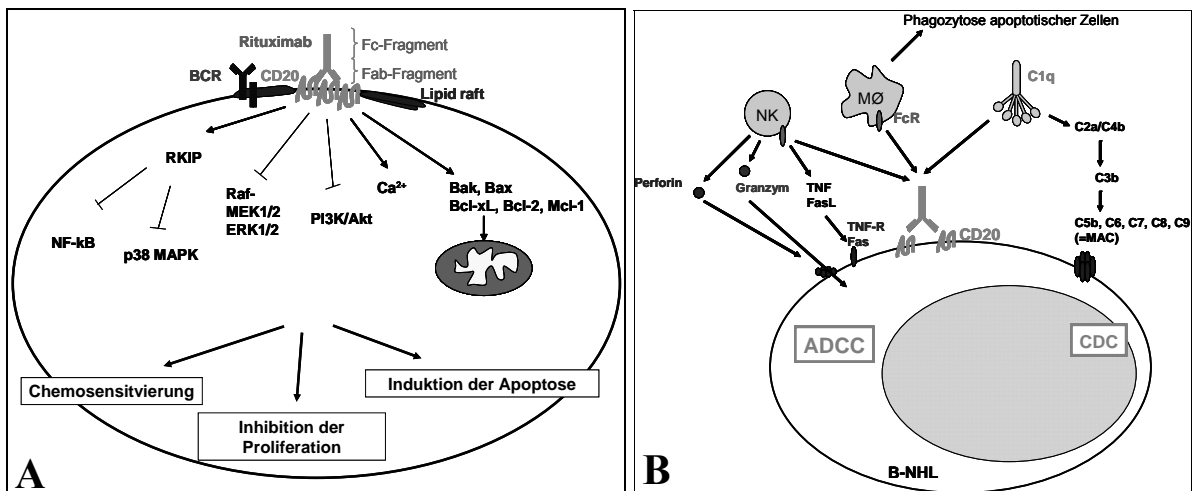


Abbildung 1.5 A) Direkte und B) indirekte Wirkmechanismen von Rituximab. (A) Die Bindung von Rituximab an CD20 auf den B-NHL führt zur Modulation der intrazellulären Signalwege von NF- κ B, p38 MAPK, ERK1/2 und PI3K. Des Weiteren kommt es zum Anstieg von Calcium-Ionen im Zytoplasma und Inhibition von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie. Die Änderung der intrazellulären Signaltransduktion führt zur Induktion des intrinsischen Apoptosesignalwegs, zur Inhibition der Proliferation und zur Chemosensitivierung. (B) Des Weiteren wird das Fc-Fragment des gebundenen Rituximab von verschiedenen Immuneffektoren erkannt. Mithilfe von Fc-Rezeptoren (FcR) erkennen mononukleäre Zellen, wie natürliche Killerzellen (NK) oder Makrophagen (MØ), die markierte Tumorzelle und induzieren antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Dabei werden die Zielzellen mittels Perforin oder Granzym lysiert sowie die extrinsische Apoptose über Fas-Liganden oder Tumornekrosefaktor (TNF) induziert. Das Fc-Fragment von Rituximab wird außerdem von der Komplementkomponente C1q erkannt. Dadurch wird die klassische Komplementkaskade eingeleitet und führt zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) und zur Lyse der Tumorzelle (komplementvermittelte Zytotoxizität, CDC).

Bisher gilt die Hypothese, dass die antitumoralen Wirkungen von Rituximab *in vivo* vor allem auf den indirekten Wirkmechanismen der antikörperabhängigen, zellvermittelten Lyse der Zielzelle (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) und der komplementabhängigen Zelllyse (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) basieren (Cragg und Glennie, 2004). Bei der ADCC erkennen Immuneffektorzellen, wie z.B. Natürliche Killerzellen (NK)-Zellen oder Makrophagen, den Fc-Teil des gebundenen Antikörpers mithilfe ihrer Fc-Rezeptoren. Dies induziert über Freisetzung von Perforin und Granzym die Lyse der Tumorzelle. Des Weiteren kann durch die Immuneffektorzellen über den Todesrezeptor Fas (CD95) oder den Tumornekrosefaktor (TNF) der extrinsische Apoptosesignalweg in den B-NHL-Zellen induziert werden (Abb. 1.5B) (Fischer et al., 2006; Macor et al., 2007; Wang et al., 2008).

Die CDC ist ein weiterer indirekter Mechanismus, durch den Rituximab-markierte Tumorzellen lysiert werden können. Das Fc-Fragment von Rituximab wird von der Komplementkomponente C1q erkannt und darüber der klassische Komplementsignalweg eingeleitet, der zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC, *membrane attack complex*) führt (Abb. 1.5B) (Di Gaetano et al., 2003; Golay et al., 2000; Zhou et al., 2008). Die relative Bedeutung dieser direkten und indirekten Wirkmechanismen von Rituximab *in vivo* wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (Cragg und Glennie, 2004; Manches et al., 2003; van Meerten et al., 2006).

1.3 Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab-Therapie

1.3.1 Molekulare Ursachen für die Rituximab-Resistenz

Neben der primären Resistenz gegenüber Rituximab-Behandlung von B-NHL-Patienten (siehe Abschnitt 1.1.4) konnten *in vitro* auch sekundäre Resistenzen beobachtet werden (Coiffier et al., 2002; Jazirehi et al., 2007; Pfreundschuh et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Tomita et al., 2007). Die Ursachen für diese Resistenzen sind bisher unbekannt.

Mögliche Ursachen einer Rituximab-Resistenz könnten auf den Änderungen der CD20-Expression und Konformation sowie auf dem Verlust der Erkennung durch Immuneffektoren beruhen (Bannerji et al., 2003; Czuczman et al., 2008; Mankai et al., 2008; Müller et al., 2008; Winiarska et al., 2008). Bei letzterem beeinflusst der genetische Hintergrund der Patienten den Therapieerfolg. Ein Beispiel dafür sind Fc-Rezeptor-Polymorphismen, welche die Effektivität der ADCC beeinflussen können (Dall'Ozzo et al., 2004; Hatjiharissi et al., 2007; Kim et al., 2006; Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Bei einzelnen Patienten wurde auch die Herunterregulation oder der Verlust von CD20 nach Rituximab-Therapie beschrieben (Haidar et al., 2003; Kennedy et al., 2002; Tomita et al., 2007; varo-Naranjo et al., 2003).

Generelle tumorzellintrinsische Resistenzmechanismen gegenüber Tumorthérapien basieren vorrangig auf der Änderung von intrazellulären Signalwegen, die das Zellwachstum aktivieren und die Apoptose inhibieren. Auf die zentralen, intrazellulären Signalwege von PI3K, MAPK und intrinsischer Apoptose, die möglicherweise an einer Resistenz gegenüber Rituximab beteiligt sind, wird in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen.

1.3.2 Intrinsischer Signalweg der apoptotischen Caspasenaktivierung

Der programmierte Zelltod (Apoptose) kann entweder über den extrinsischen oder den intrinsischen, „mitochondrialen“ Signalweg aktiviert werden (Abb. 1.6). Dabei wird die Apoptose durch verschiedene Signale, wie z.B. DNA-Schäden, extrazelluläre oder intrazelluläre Stressfaktoren sowie durch Immunzellen, eingeleitet. Morphologische Merkmale apoptotischer Zellen sind charakteristische Membranveränderungen, Verkleinerung der Zellen, Chromatinkondensation, Degradation chromosomaler DNA und die Bildung von apoptotischen Körperchen, die durch Makrophagen phagozytiert werden. Dieses Prinzip macht man sich bei der Tumorthherapie zunutze und versucht gezielt Apoptose in Tumorzellen zu induzieren.

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Dazu gehören die pro-apoptotischen BH1-2-3 (*Bcl-2 homology domain 1-2-3*)–Proteine Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) und Bax (*Bcl-2 associated x protein*), die pro-apoptotischen BH3-only Proteine sowie die anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-x_L (*B-cell leukemia/lymphoma xL*), Mcl-1 (*myeloid cell leukaemia*) und Bfl-1 (*BCL2A1, Bcl-2 related protein A1*) (Abb. 1.6) (Alfredsson et al., 2005; Cory und Adams, 2002; Green und Kroemer, 2004; Strasser, 2005; Youle und Strasser, 2008; Zhuang und Brady, 2006).

Bak und Bax bilden durch Homo- und Heterodimerisierung Poren in der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Dadurch strömt pro-apoptotisches SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspase*), AIF (*apoptosis-inducing factor*) und Cytochrom c aus dem Membranzwischenraum der Mitochondrien in das Zytoplasma. Cytochrom c induziert zusammen mit Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP) die Ausbildung des Apoptosomkomplexes bestehend aus APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Caspase-9 (*cysteiny-l-aspartate specific protease 9*), wodurch die Effektorcaspase-3 gespalten und aktiviert wird (Cory und Adams, 2002; Fesik, 2005; Igney und Krammer, 2002). Nach Dimerisierung spaltet aktive Caspase-3 z.B. das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), den Zellzyklusinhibitor PAK2 (*p21-activated kinase 2*), die Lamine der Zellkernmembran, den DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF) und den Inhibitor der DNase CAD (ICAD, *inhibitor of caspase activated DNase*) (Abb. 1.6) (Hengartner, 2000). Das führt zu den bereits beschriebenen charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen.

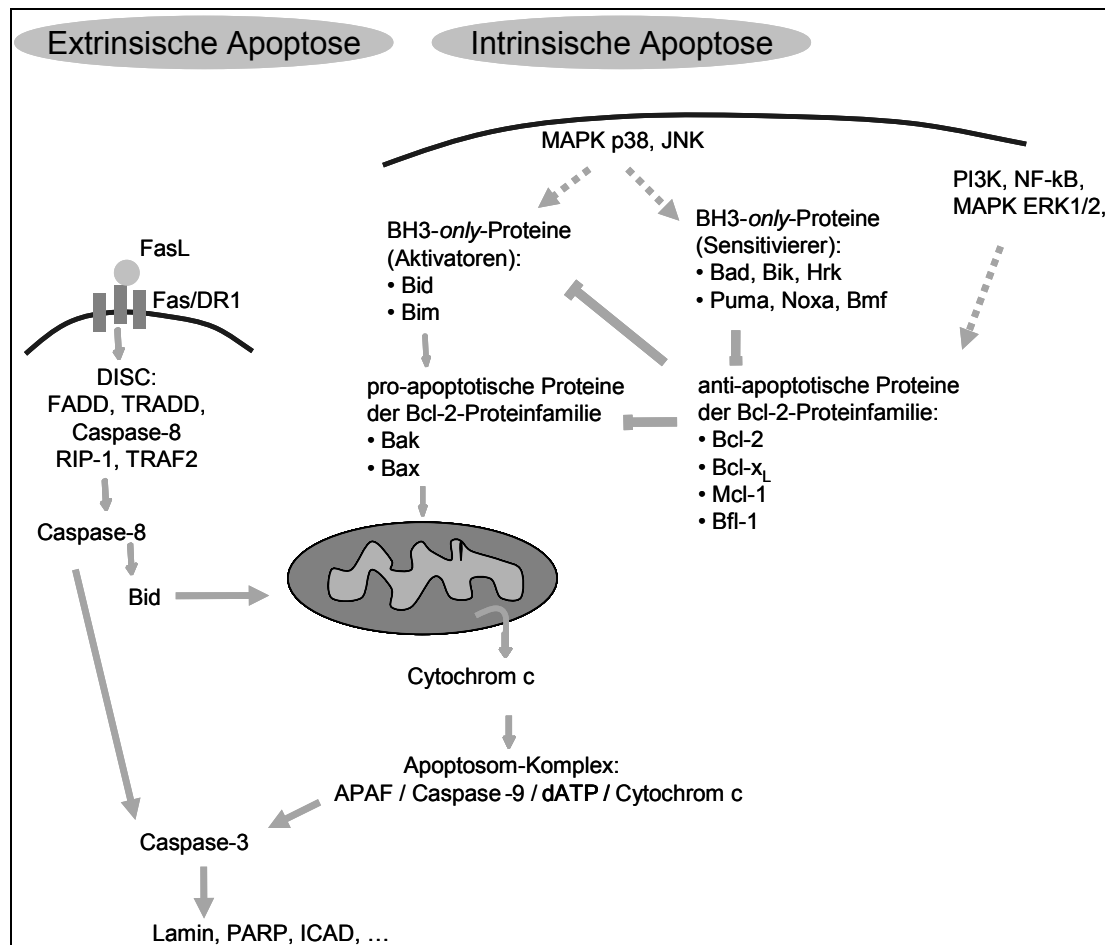


Abbildung 1.6 Extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg. Der programmierte Zelltod kann entweder extrazellulär über Todesrezeptoren (z.B. Fas) und der Bildung des DISC (*death inducing signaling complex*) induziert werden oder intrazellulär z.B. über DNA-Schäden (p53) oder die Stresskinasen (JNK, p38). Der intrinsische Apoptosesignalweg ist durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Nach Induktion der intrinsischen Apoptose kommt es zur Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch Bak und Bax und zum Ausstrom von Cytochrom c in das Zytoplasma. Durch die Bildung des Apoptosom-Komplexes wird die Effektorcaspase-3 aktiviert und spaltet verschiedene Zielmoleküle.

Intrinsische Apoptoseresistenzen von Tumorzellen beruhen größtenteils auf einer erhöhten Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L, Bcl-2 oder Mcl-1, einer Inhibition der pro-apoptotischen Proteine Bak, Bax sowie der pro-apoptotischen BH3-only Proteine Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*), Bid (*BH3 interacting domain death agonist*), Bik (*Bcl-2-interacting killer*) oder Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*) (Berns et al., 2007; Hanahan und Weinberg, 2000; Igney und Krammer, 2002; Wobser et al., 2007). Bisher beschriebene molekulare Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab implizieren eine reduzierte Expression der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax sowie eine Hochregulation der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Mcl-1 (Bonavida, 2007; Hussain et al., 2007; Olejniczak et al., 2008).

1.3.3 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg

Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert zentral die Aktivierung der Proteinsynthese, des Zellwachstums und der Apoptosehemmung. Die Lipidkinase PI3K wird durch verschiedene Rezeptortyrosinkinasen (RTK), der Phospholipase C, der Janus-Kinase (JAK) oder der GTPase Ras aktiviert und gibt intrazellulär das Signal über Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate (PIP₃) weiter. Das PIP₃ wird von der PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*) der Serin/Threoninkinase Akt (Proteinkinase B) und PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) gebunden. Daraufhin wird Akt von PDK1 an der Aminosäure Threonin-308 und durch mTORC2/Rictor (*mammalian target of rapamycin complex 2*) an Serin-473 phosphoryliert und aktiviert. Die PI3K-abhängige Aktivierung von Akt wird durch den Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) inhibiert, indem PTEN PIP₃ wieder zu PIP₂ dephosphoryliert (Abb. 1.7) (Carracedo und Pandolfi, 2008).

Innerhalb der intrazellulären Signaltransduktion inhibiert oder aktiviert Akt über Phosphorylierung verschiedene Proteine, die am Zellzyklus oder der Apoptose beteiligt sind. Beispielsweise werden die cdk (*cyclin-dependent kinase*)-Inhibitoren p21 und p27 sowie das Protoonkogen Cyclin D1, ein Regulator des G1-S-Zellzyklusübergangs, durch Akt reguliert und dadurch das Zellwachstum aktiviert. Des Weiteren inhibiert Akt direkt die pro-apoptotischen Proteine Bad, Bax und wahrscheinlich auch Caspase-9, wodurch die Apoptose gehemmt wird (Abb. 1.7) (Bader et al., 2005; Carracedo und Pandolfi, 2008; Cully et al., 2006; Mills et al., 2008; Tsuruta et al., 2002; Vivanco und Sawyers, 2002; Yuan und Cantley, 2008).

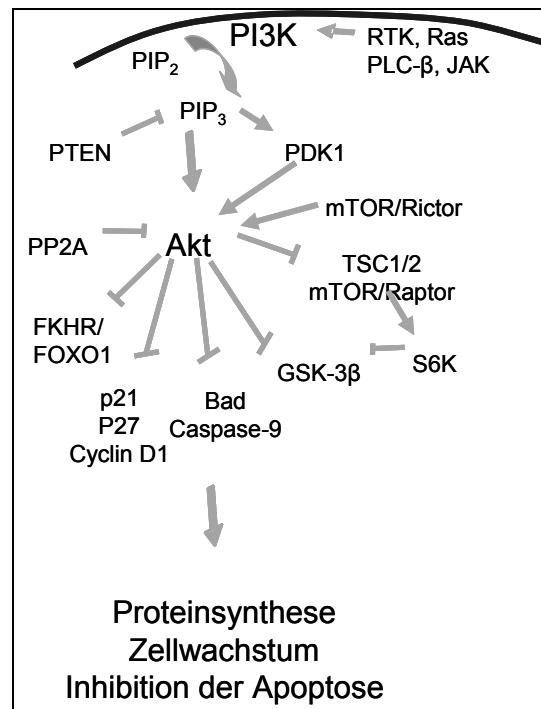


Abbildung 1.7 Phosphoinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg. Extrazelluläre Wachstumsfaktorsignale sowie intrazelluläre Signalwege aktivieren die Lipidkinase PI3K, was zur Aktivierung der Proteinkinase Akt führt. Akt reguliert zentral die Aktivität verschiedener Proteine, die am Zellzyklus und der Apoptose beteiligt sind. Dadurch wird das Zellwachstum gesteigert und die Hemmung der Apoptose eingeleitet.

Häufig zeigen Tumore eine konstitutive Aktivierung des onkogenen PI3K-Signalweges. Dies kann entweder auf Mutationen innerhalb der katalytischen Domäne der PI3K (p110) oder auf dem Verlust von PTEN basieren (Bader et al., 2005; Uddin et al., 2006; Yuan und Cantley, 2008). Präklinische und klinische Studien untersuchen derzeit verschiedene PI3K- und Akt-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit bei der Behandlung von verschiedenen Tumoren (Garcia-Echeverria und Sellers, 2008).

Über den Einfluss von Rituximab auf den PI3K/Akt-Signalweg *in vitro* und *in vivo* ist bisher nur wenig bekannt. Anhand von Rituximab-resistenten B-NHL-Zellklonen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Rituximab die konstitutive Aktivierung von Akt hemmen und die resistenten B-NHL-Zelllinien gegenüber Zytostatika sensitivieren kann (Suzuki et al., 2007; Wanner et al., 2006).

1.3.4 Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Signalweg

Der MAPK-Signalweg ist ein mehrstufiger intrazellulärer Signaltransduktionsweg, der an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist. Der ERK1/2-Signalweg wird durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren induziert. Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion über die onkogene GTPase Ras, die MAPK-Kinase-Kinase (MKKK) c-Raf und die dual-spezifischen Kinasen MEK1/2 an ERK1/2 weiter gegeben. ERK1/2 phosphoryliert verschiedene Transkriptionsfaktoren und aktiviert dadurch Zellwachstum und Differenzierung (Abb. 1.8).

Die Stresskinasen p38 und JNK werden ebenfalls über MAPK-Kinasen (MKK) aktiviert und leiten durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Stressantwort, Entzündung und Apoptose ein (Abb. 1.8) (Gallo und Johnson, 2002; Sahai und Marshall, 2002; Sebolt-Leopold und Herrera, 2004).

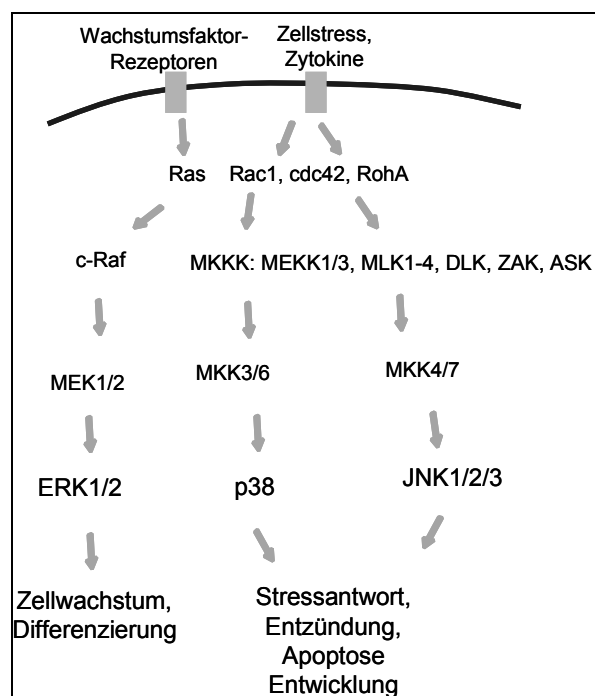


Abbildung 1.8 MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK. Der mehrstufige MAPK-Signalweg leitet extrazelluläre Signale von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen intrazellulär weiter. Innerhalb des ERK1/2-Signalwegs werden die extrazellulären Wachstumssignale über die GTPase Ras, die Proteinkinase c-Raf und MEK1 an ERK1/2 weiter geleitet. ERK1/2 reguliert verschiedene Transkriptionsfaktoren, wodurch das Zellwachstum und Differenzierung eingeleitet wird. Die beiden MAPK-Signalwege p38 und JNK werden durch Zytokine oder extrazelluläre Stresssignale über den MAPK-Kinase-Kinase (MKKK)-Signalwege aktiviert und induzieren über die Regulation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren eine Stressantwort, Entzündungsreaktion oder Apoptose.

Über die Regulation der MAPK-Signalwege durch Rituximab ist bisher ebenfalls nur wenig bekannt und die Ergebnisse sind teilweise kontrovers. Von Pedersen et al. (2002) wurde beschrieben, dass Rituximab die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK induziert. Andere Gruppen fanden, dass Rituximab hemmend auf den ERK1/2- und p38 MAPK-Signalweg in B-NHL über RKIP (*Raf kinase inhibitor protein*) oder in B-CLL über PKC ζ wirkt (Jazirehi et al., 2004b; Leseux et al., 2008; Vega et al., 2004).

In vitro erzeugte, Rituximab-resistente B-NHL-Zellklone, die durch Langzeitkultivierung mit suboptimalen Konzentrationen von Rituximab sekundäre Resistenzen entwickelten, zeigten eine Hyperaktivierung der Signalwege von ERK1/2 und p38 (Jazirehi et al., 2007; Suzuki et al., 2007). Diese Arbeiten zeigen, dass Rituximab die MAPK-Signalwege modulieren kann und wahrscheinlich über diesen Signaleweg die B-NHL-Zellen *in vitro* chemosensitiviert. Inwieweit diese Modulation einen Einfluß auf das Zellüberleben, Wachstum oder Apoptose hat, muß noch weiter aufgeklärt werden.

1.4 Hypothesen und Zielsetzung

Um die Therapie von B-NHL-Patienten zu verbessern, ist es wichtig, die Effektorfunktionen von Rituximab und mögliche Resistenzmechanismen zu kennen. Rituximab wird seit mehr als 10 Jahren erfolgreich für die Behandlung von B-NHL-Patienten eingesetzt, ohne dass die direkten und indirekten Wirkmechanismen vollständig aufgeklärt sind. Auch wurden Resistenzen gegenüber Rituximab-Therapie von B-NHL beobachtet, die nicht durch den Verlust des CD20 Antigens zu erklären sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine molekulare Charakterisierung direkter Wirkmechanismen von Rituximab, mit Fokus auf der intrinsischen Apoptose und der Modulation intrazellulärer Signaltransduktionswege. Dafür soll die Sensitivität von verschiedenen B-NHL-Zelllinien gegenüber Rituximab-Behandlung *in vitro* verglichen und die molekularen Ursachen von bestehenden Resistenzen gegenüber Rituximab aufgeklärt werden. Die identifizierten Resistenzmechanismen sollen in einem B-NHL-Xenotransplantationsmodell in immuninkompetenten NOD/SCID-Mäusen *in vivo* sowie anhand primärer Proben von Rituximab-behandelten B-NHL-Patienten validiert werden. In darauf basierenden Untersuchungen soll nach Möglichkeiten zur Sensitivierung von Rituximab-resistenten B-NHL *in vitro* und *in vivo* gesucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Firma
Bestrahlungsgerät: Typ CDCK 4905 CS 137	GE Healthcare Buchler, Braunschweig
Chemilumineszenzdetektion: Chemi-Smart 5100	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Durchflusszytometer: BD FACSCanto™ II	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer: FC 500	Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophorese: B2	PeqLab, Erlangen
Elektrophorese: Mini Protean 2	BioRad, München
ELISA-Reader: Microplate Reader Model 680	BioRad, München
Fluoresezenzassoziierter Zellsorter: BD FACS Aria™	Becton Dickinson, Heidelberg
Geldokumentation: BIO VISIO +300	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Tank-Blot-System: Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
N ₂ -Tank-System	Consarctic, Schöllkrippen
7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystem, Darmstadt
Thermocycler: iCycler	BioRad, München

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung (30 %ig, mit 0,8 % Bisacrylamid) Rothiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat (NH ₄ Ac)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	Roth, Karlsruhe
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Sigma-Aldrich, München
Dextrose	Roth, Karlsruhe
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, München
Gelatine	Sigma-Aldrich, München

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel-de Haen, Rodenberg
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
β -Merkaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Fluka, Buchs
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
NP-40 (Nonylphenoxypolyethoxyethanol)	Fluka, Buchs
Paraformaldehyd (4 %ig, Rot [®] -Histofix)	Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma-Aldrich, München
Polybrene	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka, Buchs
Sucrose	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (Octoxinol-9, Oktylphenolethoxylate)	Roth, Karlsruhe
Tween-20 (Polysorbat 20)	Roth, Karlsruhe
(Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	

2.1.3 Farbstoffe

Farbstoffe	Firma
Bromphenol	Roth, Karlsruhe
Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFDA-SE)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid (3,8 Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium-bromid)	Fluka, Buchs
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylrhodaminethylenester (TMRE)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Buchs
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Stammlösungen und Puffer

Ammoniumchlorid-Puffer (Lagerung bei Raumtemperatur (RT))	155 mM NH ₄ CL 10 mM KHCO ₃ 100 mM EDTA
Ammoniumpersulfat (Lagerung bei RT)	10 % (w/v)
Caspasenpuffer (Lagerung bei 4 °C)	20 mM PIPES, pH 7,2 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % (w/v) CHAPS 10 % (w/v) Sucrose 10 mM DTT
CEB (<i>cytoplasmic extraction buffer</i>)-Puffer (Lagerung bei 4 °C)	20 mM HEPES, pH 7,5 10 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 0,25 M Sucrose 2 mM DTT 10 µM Cytochalasin B 10 µM Cytochrom c 1 mM dATP
Dehybridisierungslösung (Strippen) (Lagerung bei RT)	62,5 mM Tris, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 100 mM β-Merkaptoethanol
DNA-Agarosegelelektrophorese-Ladepuffer (6x) (Lagerung -20 °C)	0,25 % (w/v) Bromphenol 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerin
HBS (<i>HEPES buffered saline</i> , 2x) (Lagerung -20 °C)	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Dextrose 50 mM HEPES, pH 7,0
HFS (<i>hypotonic fluorescent solution</i>)-Puffer (Lagerung bei 4 °C)	0,07 mM Propidiumiodid 3,9 mM Natriumcitrat 0,1 % (v/v) TritonX-100
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Lagerung bei RT)	10 % (w/v), pH 7,2
NET-G Blockpuffer (10x) (Lagerung bei RT)	150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 7.5 0.05 % (v/v) Tween-20

	0.25 % (w/v) Gelatine
NP-40-Lysepuffer (Lagerung bei 4 °C)	150 mM NaCl 50 mM Tris, pH 8,0 1 % (v/v) NP-40 Vor Gebrauch erst zusetzen: 1x Protease-Inhibitor 1x Phosphatase-Inhibitor I/II
PBS/Tween-Puffer (Lagerung bei RT)	0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS
Polyacrylamidgelelektrophorese-Ladepuffer (6x) (Lagerung bei -80 °C)	600 mM Tris, pH 6,8 24 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenol 20 % (v/v) Glycerin 200 mM β -Merkaptoethanol
Polyacrylamidgelelektrophorese-Laufpuffer (5x) (Lagerung bei RT)	125 mM Tris, pH 8,3 1 M Glycerin 17 mM SDS
Polyacrylamidgelelektrophorese-Transferpuffer (5x) (Lagerung bei 4 °C)	239 mM Tris, pH 9 193 mM Glycerin 6,4 mM SDS
PonceauS-Färbelösung (Lagerung bei RT)	3 % (v/v) Trichloressigsäure 2 % (w/v) PonceauS
Propidiumiodid-Färbelösung (500x) (Lagerung bei 4 °C)	100 μ g/ml Propidiumiodid in PBS
Sammelgel (5 %)	30 % (v/v) Acrylamid 1,5 M Tris, pH 8,0 10 % (v/v) SDS 0,01 % (v/v) TEMED 10 % (v/v) APS
Trenngel (12 %)	30 % (v/v) Acrylamid 1 M Tris, pH 6,8 10 % (v/v) SDS 0,04 % (v/v) TEMED 10 % (v/v) APS
Trisacetatethylendiamintetraessigsäure (TAE, 50x)	2 mM Tris, pH 8,0 5,7 % (v/v) 100 %ige Essigsäure 0,05 M EDTA
Tris-EDTA-Puffer (TE)	100 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA

Trishydroxymethylaminomethan (Tris)-Puffer	1 M Tris, pH6,8 1,5 M Tris, pH 8,8
Western Blot-Blockpuffer	5 % (w/v) fettfreie Trockenmilch 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS

2.1.5 Längenstandard

Längenstandard	Firma
DNA-Größenstandard (1 kb Plus DNA Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Marker (PageRuler™ Prestained)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Medien und Zusätze

Medien und Zusätze	Firma
<u>Für humane Zellkultur:</u>	
DMEM (<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>)	Gibco, Eggenstein
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
D-PBS	Gibco, Eggenstein
Fibronektin	Millipore, Schwalbach
fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Eggenstein
IMDM	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
α -MEM	Gibco, Eggenstein
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco, Eggenstein
RMPI-1640 (<i>roswell park memorial institute medium</i>)	Gibco, Eggenstein
Trypsin (0,05 % (v/v))-EDTA (0,02 % (v/v))	Lonza, Köln
<u>Für Kultivierung von Bakterien:</u>	
Ampicillin (50 mg/ml, Lagerung bei -20 °C)	Sigma-Aldrich, München
Circlegrow Medium	Q-Bio-Gene, Heidelberg
Kanamycin (25 mg/ml, Lagerung bei -20 °C)	Sigma-Aldrich, München
LB-Agar-Medium	Q-Bio-Gene, Heidelberg

2.1.7 Enzyme

Enzym	Firma
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, München
Deoxyribonuklease I (DNase)	Roche, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor 1 und 2	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>Bam</i> HI	Roche, Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>Eco</i> RI	Roche, Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>Not</i> I	Roche, Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>Xba</i> I	Roche, Mannheim
RNase Cocktail	Ambion, Austin

2.1.8 Inhibitoren

Inhibitor	Firma
ABT-737	Abbott, Ludwigshafen
GSK-3 β Inhibitor VIII	Calbiochem, Merck
LY294002	Calbiochem, Merck
Rapamycin	Sigma-Aldrich, München
SB 202190	Calbiochem, Berlin
SH6 (Akt Inhibitor III)	Calbiochem, Berlin
Staurosporin	Sigma-Aldrich, München
Wortmannin	Millipore, Schwalbach
Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK (zVADfmk)	MP Biomedicals, Aurora

2.1.9 Fertigsysteme

Fertigsystem	Firma
ABsolute TM QPCR SYBR [®] Green mix	Abgene, Epsom
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Heidelberg
BioRad Protein Assay	BioRad, München
Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit	Calbiochem, Berlin
Caspase Detection Kit (FITC-VAD-FMK)	Calbiochem, Berlin
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation	Promega, Münster
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Human cytochrome c ELISA	BenderMedsystems, Wien
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
PureLink TM Gel Extraction Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

QIAamp DNA mini kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate	Pierce, Rockford
TaqPCR Core Kit	Qiagen, Hilden

2.1.10 Zelllinien

Zelllinien	Subtyp	DSMZ-Nr.	erhalten von
BL-2	Burkitt (EBV-)	ATCC 625	Prof. Küppers, Essen
BL-41	Burkitt (EBV-)	ATCC 160	Prof. Küppers, Essen
EHEB	B-CLL	ATCC 67	DSMZ
HT	DLBCL	ATCC 567	DSMZ
Jeko-1	MCL	ATCC 553	DSMZ
K562	CML	ATCC 10	Prof. Fischer, Mainz
Karpas-422	FL	ATCC 32	Prof. Küppers, Essen
Mec-1	B-CLL	ATCC 497	DSMZ
OCI-Ly7	DLBCL	-	Prof. Küppers, Essen
Phoenix (amphotrop)	HEK293T (humane embryonale Nierenzellen)		Dr. Nolan, Stanford
Ramos	Burkitt (EBV-)	ATCC 603	DSMZ
Rec-1	MCL	ATCC 584	Dr. Hilger, Essen
Sc-1	FL	ATCC 558	DSMZ
SU-DHL-4	DLBCL	ATCC 495	DSMZ
WSU-NHL	FL	ATCC 58	DSMZ

ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, USA

B-CLL - B-Zell-chronisch lymphatische Leukämie

CML - chronisch-myeloische Leukämie

DLBCL - diffus großzelliges Lymphom

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

EBV- - Epstein-Barr-Virus-negativ

FL - follikuläres Lymphom

MCL - Mantelzelllymphom

2.1.11 Plasmide

Plasmide	Beschreibung
pMx.pie	retrovirales Expressionsplasmid
pMx-Bcl-xL.pie	retrovirales Expressionsplasmid
pMx-DN-FADD.pie	retrovirales Expressionsplasmid
pMx-DN-Caspase9.pie	retrovirales Expressionsplasmid
pCMV.VSV-G	retrovirales Verpackungsplasmid
Hit60	retrovirales Verpackungsplasmid

Standardplasmide wurden in ‚MAX Efficiency® DH5 α TM competent cells’ (Invitrogen) amplifiziert, retrovirale Plasmide in ‚MAX Efficiency® Stbl-2TM competent cells’ (Invitrogen).

2.1.12 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer)	Sequenz (5'→3')
GAPDH_s	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC
GAPDH_as	ACGACCAAATCCGTTGACTC
Bim_s	CATCGCGGTATTCGGTTC
Bim_as	GCTTTGCCATTTGGTCTTTT
Bik_s	GAATGCATGGAGGGCAGT
Bik_as	AGGCTCACGTCCATCTCGT
Puma_s	GACTGTGAATCCTGTGCTCGTC
Puma_as	CGTCGCTCTCTCTAAACCTATGC
Noxa_s	ATGAATGCACCTTCACATTCCTCT
Noxa_as	TCCAGCAGAGCTGGAAGTCGAGTGT
Bid_s	GCTGTATAGCTGCTTCCAGTGTA
Bid_as	GCTATCTTCCAGCCTGTCTTCTC
Bad_s	GCACAGCAACGCAGATGC
Bad_as	AAGTTCCGATCCCACCAGG
Hrk_s	GGCAGGCGGAACCTTGTA
Hrk_as	CGGCCTTTCAAGCTCTGG
Bmf_s	GAGGTACAGATTGCCCCGAAA
Bmf_as	CCCCGTTTCTGTTCTCTTCT
Bcl-2_s	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA
Bcl-2_as	TTCAGAGACAGCCAGGAGAAA
Bcl-xL_s	GGCTGGGATACTTTTGTGGA
Bcl-xL_as	TGTCTGGTCATTTCCGACTG
Mcl-1_s	AAGCCAATGGGCAGGTCT
Mcl-1_as	TGTCCAGTTTCCGAAGCAT
Bak_s	TCGTACCACAAACTGGC
Bak_as	AACCGACGCTATGACT
Bax_s	TGAAGTTGCCGTCAGAAA
Bax_as	TTCATCCAGGATCGAGC

Alle Oligonukleotid-Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) oder quantitative *Real-time*-PCR (qRT-PCR) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert.

2.1.13 Antikörper

Antikörper	Klon/Bestellnr.	Firma
<u>Therapeutische Antikörper:</u>		
Rituximab (anti-CD20)	MabThera [®]	Roche, Mannheim
Cetuximab (anti-EGFR)	Erbitux [®]	Merck, Darmstadt
F(ab') ₂ anti-human Immunglobulin	H17100	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Antikörper für Immundetektion:</u>		
Aktin	C4	ICN Biomedicals
AKT1/2	sc-8312	Santa Cruz Biotechnology
pAkt(Ser473)	#9271	Cell Signaling
pAkt(Thr308)	#4056	Cell Signaling
Bad	#9292	Cell Signaling
Bak	# AM03	Calbiochem, Berlin
Bax	# 06-499	Millipore
Bcl-2	sc-7382	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-x _L	#2764	Cell Signaling
Bfl-1	Antiserum	Prof. Borst, Amsterdam
Bid	MAB860	R&D Systems
Bik	#4592	Cell Signaling
Bim	#2819	Cell Signaling
CD20	L26	Dako
CD52	sc-51560	Santa Cruz Biotechnology
ERK1/2	#9102	Cell Signaling
pERK1/2(Thr202/Tyr204)	#9106	Cell Signaling
FKHR	#9462	Cell Signaling
pFKHR(Ser256)	#9461	Cell Signaling
pFKHR(Thr24/Thr32)	#9464	Cell Signaling
GSK3β	#9332	Cell Signaling
pGSK3β(Ser9)	#9336	Cell Signaling
JNK/SAPK	#9252	Cell Signaling
pJNK/SAPK(Thr183/Tyr185)	#9255	Cell Signaling
Ki67	BGX-297	Biogenex
Lyn	sc-7274	Santa Cruz Biotechnology
pLyn(Tyr507)	#2731	Cell Signaling
Mcl-1	#sc-819	Santa Cruz Biotechnology
p38 MAPK	#9228	Cell Signaling
p-p38 MAPK	#9211	Cell Signaling
PDK1	#3062	Cell Signaling
pPDK1	#3061	Cell Signaling
PLCγ2	#3872	Cell Signaling
pPLCγ2(Tyr1217)	#3871	Cell Signaling
PTEN	#9552	Cell Signaling
Syk	#2712	Cell Signaling
pSyk(Tyr525/526)	#2710	Cell Signaling
pSer/Thr	ab17464	Abcam
pTyr	4G10	Millipore

markierte, sekundäre Antikörper:

anti-Maus IgG-Peroxidase	31430	Pierce Biotechnology
anti-Hase IgG-Peroxidase	31460	Pierce Biotechnology
anti-Ratte IgG-Peroxidase	31470	Pierce Biotechnology
anti-Maus IgG-PE	sc-3761	Santa Cruz Biotechnology
anti-Hase IgG-FITC	sc-2012	Santa Cruz Biotechnology
anti-Human IgG1-FITC	F0767	Sigma-Aldrich

2.2 Methoden

2.2.1 Nukleinsäureanalytik

2.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolation von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus eukaryotischen Zellen wurde das ‚QIAamp DNA Mini Kit‘ (Qiagen) verwendet. Der Zellaufschluss und die Proteindenaturierung erfolgten mit Natriumdodecylsulfat (SDS), Proteinase K und der chaotropen Substanz Guanidinhydrochlorid. Durch 1 h RNase-Behandlung bei 37 °C wurde kontaminierende Ribonukleinsäure (RNA) abgebaut. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über Silikasäulen als Anionenaustauscher, an die negativ geladene DNA bindet. Die gebundene DNA wurde mit destilliertem Wasser oder TE-Puffer eluiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Isolation von RNA wurde das ‚High Pure RNA Isolation Kit‘ (Roche) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte, wie bereits beschrieben, über Silikasäulen und mit Lagerung bei -80 °C. Die Zugabe von RNase-Inhibitoren verhinderte zusätzlich den Abbau der RNA durch RNasen.

Alle molekularbiologischen Standardmethoden erfolgten auf der Basis des Laborhandbuches ‚*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*‘ (Sambrook und Russell, 2001).

2.2.1.2 DNA-Fällung

Um die DNA aufzukonzentrieren oder weiter zu reinigen, wurde die Präzipitation mit Ethanol verwendet. Dafür wurde die DNA-Lösung mit 0,5 Volumenanteilen (v/v) 7,5 M Ammoniumacetat (NH_4Ac) und 2,5 v/v eiskaltem, absolutem Ethanol gemischt und für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Aufgrund der Polarität der DNA durch die negativ geladenen Phosphatreste, präzipitiert diese mit positiv geladenen Ammoniumionen (NH_4^+) in Ethanolhaltigen Lösungen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 14000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Pellet getrocknet und in Tris/EDTA-Puffer oder destilliertes Wasser aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus den *Escherichia coli* (*E. coli*)-Laborstämmen DH5 α und Stbl-2 (Invitrogen) wurde das 'QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit' (Qiagen) verwendet. Aus kryokonservierten Bakterienkulturen, die mit 50 % Glycerin versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, erfolgte über Nacht die Kultivierung einer Starter-Kultur in 10 ml Circlegrow-Medium. Diese Kultur wurde für weitere 24 h in 250 ml Medium bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 rpm kultiviert.

Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dabei löst das im Puffer enthaltene Detergenz SDS Phospholipide und Proteine der Zellwände, während Natronlauge (NaOH) Proteine und chromosomale DNA denaturiert. Saurer Kaliumacetat-haltiger Puffer neutralisiert und fällt aufgrund der hohen Salzkonzentration Zellreste, Proteine, RNA und genomische DNA aus. Die Plasmid-DNA wird, wie bereits in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, mit einer Silikasäule aufgereinigt.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei einer Extinktion (OD, *optical density*) von 260 nm. Die Reinheit wurde aus dem Quotienten 260/280 nm abgeleitet, da Verunreinigungen mit aromatischen Proteinen bei 280 nm absorbieren. Reine Nukleinsäuren besitzen ein 260/280-Verhältnis von 2,0. Bis zu einem Quotienten von 1,8 wurden die Nukleinsäureaufreinigungen für weitere Analysen verwendet.

2.2.1.5 Restriktionsanalyse

Die Charakterisierung und Identifizierung der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe der Restriktionsanalyse, bei der Restriktionsendonukleasen vom Typ II sequenzspezifisch die DNA schneiden (Arber et al., 1969; Pingoud und Jeltsch, 2001). Der Restriktionsansatz, bestehend aus Plasmid-DNA, Restriktionsenzym und Restriktionspuffer, wurde bei 37 °C für 3 h inkubiert, mithilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit der Software VectorNTI (Invitrogen) ausgewertet und bestätigt.

2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Qualität und Größe der isolierten Nukleinsäuren wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese kontrolliert (Hjerten et al., 1971). RNA und DNA sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung erfolgte im Agarosegel mit einem Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer als Laufpuffer. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und verändert dadurch sein Absorptionsspektrum (Le Pecq et al., 1966). Nach Anregung mit ultraviolettem (UV)-Licht fluoresziert es bei 366 nm orange-rot. Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Geldokumentationssystem BIO-VISION +300 (Vilber Lourmat) aufgenommen und mit der Software VISION-Capt und Bio1D (Vilber Lourmat) ausgewertet.

2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion

Die Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*). Dabei wird der DNA-Abschnitt zwischen zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) durch eine thermostabile DNA-Polymerase vervielfältigt (Saiki et al., 1988; Chien et al., 1976; Saiki et al., 1985; Mullis und Faloona, 1987).

Die Reaktion wurde durch eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 min gestartet. Danach liegt die DNA in Einzelsträngen vor. Es folgten 30 - 35 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 30 sek, Primer-Anlagerung bei 55 – 65 °C für 1 min und DNA-Synthese (Elongation) bei 72 °C für 30 sek. Für den PCR-Ansatz wurde das ‚Taq PCR Core Kit‘ (Qiagen) verwendet, das erhaltene PCR-Produkt mit dem ‚QIAquick® PCR Purification Kit‘ (Qiagen) aufgereinigt und die Produktgröße mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

2.2.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von spezifischen DNA-Abschnitten erfolgte mit sequenzspezifischen Primern durch die Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg) mit dem Didesoxyverfahren nach Sanger (Sanger und Coulson, 1975; Maxam und Gilbert, 1977). Die erhaltene DNA-Sequenz wurde mit der Software SeqMan und EditSeq (DNASTAR, Konstanz), sowie mit der Datenbank BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides*) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ausgewertet.

2.2.1.9 Quantitative *Real-time*-Polymerasekettenreaktion

Der Nachweis der differentiellen Genexpression erfolgte mithilfe der quantitativen *Real-time*-PCR (qRT-PCR), mit der die vorhandene Menge an spezifischer mRNA in einer Zellpopulation bestimmt werden kann (Higuchi et al., 1992; Nolan et al., 2006). Die vorhandene mRNA spiegelt die Transkriptionsaktivität eines Gens wieder.

Aus der isolierten RNA wurde die mRNA mit oligo(dT)-Primern, die sich an das Poly(A)-3'-Ende der mRNA anlagern, mithilfe der Reversen Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben (Temin et al., 1988).

5 µg RNA wurden mit dem ‚Omniscript RT Kit‘ (Qiagen) bei 42 °C für 90 min mit Reversen Transkriptase inkubiert, wobei die entsprechende cDNA synthetisiert wurde. Die verwendete Reverse Transkriptase besitzt eine RNase H-Aktivität, durch die restliche RNA bei 70 °C für 15 min abgebaut wurde.

Die cDNA wurde anschließend mittels qRT-PCR amplifiziert und dabei quantifiziert. Während der PCR interkaliert der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I zwischen die Basenpaare der DNA und die Fluoreszenz verhält sich proportional zu der Menge des PCR-Produkts (Zipper et al., 2004). Dafür wurden 2 µl einer 1 : 10-Verdünnung der cDNA mit dem ‚ABsolute™ QPCR SYBR® Green mix‘ (Abgene) und Gen-spezifischen Primern amplifiziert und mit dem ‚7300 Real-Time PCR System‘ (Applied Biosystem) detektiert und mit der SDS v1.4 Software analysiert.

Mithilfe der delta-delta-ct-Wert ($\Delta\Delta\text{ct}$)-Methode wurde die Änderung der Genexpression berechnet. Der ct-Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert) ist der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über den Hintergrund ansteigt. Die Normalisierung der Expression des Zielgens (GOI, *gene of interest*) erfolgte anhand der Expression des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH).

Der Δct -Wert berechnet sich aus dem ct-Wert des Zielgens (ct_{GOI}) subtrahiert mit dem ct-Wert des Referenzgens (ct_{GAPDH}) (1). Anhand der Δct -Werte von zwei unterschiedlichen Proben, die miteinander verglichen werden sollen (z.B. behandelte und unbehandelte Proben), erhält man den $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert (2). Aus diesem Wert kann mit der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ die Änderung der Expression eines bestimmten Gens relativ quantifiziert werden (3) (Zipper et al., 2004).

Berechnung: (1) $\Delta\text{ct} = \text{ct}_{\text{GOI}} - \text{ct}_{\text{GAPDH}}$

(2) $\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct}_{\text{behandelt}} - \Delta\text{ct}_{\text{unbehandelt}}$

(3) Änderung der Genexpression durch Behandlung = $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$

2.2.1.10 Retrovirale Transduktion

Mithilfe der retroviralen Transduktion kann ein Zielgen (GOI, *gene of interest*) durch Verpackung in Viruspartikel in die genomische DNA eukaryotischer Zellen eingebaut werden. Die LTR (*long terminal repeat*)-Integrase baut das Fremdgen zwischen 3'- und 5'-LTR-Sequenzen in das Wirtsgenom ein (Goff und Berg, 1976; Mann et al., 1983; Graham und Vandereb, 1973). Das zu untersuchende Gen wird über einem im Plasmid enthaltenen, Promoter, z.B. den Cytomegalievirus (CMV)-Promoter, exprimiert. Nach Analyse des Phänotyps der Zielzellen kann teilweise auf die Funktion des Gens geschlossen werden.

Für die Produktion retroviraler, replikationsdefizienter Virionen wurde die amphotrope Verpackungszelllinie Phoenix mithilfe der Calciumphosphat-Methode mit retroviralen Expressions- und Verpackungsvektoren transfiziert. In dem Gemisch aus Calciumchlorid, Natriumhydrogenphosphat und Plasmid-DNA fällt Calciumphosphat aus und bindet an die DNA. Die ausgefallenen Präzipitate werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Von der Verpackungszelllinie werden die Plasmid-kodierten Proteine exprimiert und replikationsdefiziente Virionen sekretiert (Graham und Vandereb, 1973; Bacchetti und Graham, 1977).

Die verwendeten retroviralen Verpackungsplasmide pCMV.VSV-G und Hit60 kodieren für das Hüllprotein, das G-Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) sowie für das gag-pol-Polyprotein des murinen Leukämievirus (MLCV), aus dem die Reverse Transkriptase und Integrase prozessiert werden (Soneoka et al., 1995). VSV-G-pseudotypisierte Virionen können alle eukaryotische Zellen effizient infizieren (Akkina et al., 1996).

Der retrovirale Expressionsvektor pMx.pie codiert für das zu untersuchende Gen zwischen der 3'- und 5'-LTR, wodurch dieser Abschnitt in die genomische DNA der Zielzellen eingebaut wird. Außerdem kodiert das Plasmid für die virale Verpackungssequenz Ψ , mit der die Nukleinsäure in die Virushülle verpackt wird. Als Reportergen wurde das EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) verwendet, dass über eine IRES (*internal ribosomal entry site*) von der bicistronischen mRNA translatiert wird. Dabei wird die Sekundärstruktur der IRES mRNA von den Ribosomen erkannt und die Translation eingeleitet. Anhand der EGFP-Expression wurde indirekt die Transfektions- und Transduktionseffizienz mit dem Durchflusszytometer oder dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Die Phoenix-Zellen wurden auf Fibronektin in 10 cm² Zellkulturschalen ausgesät und mit 1,5 µg Plasmid-DNA der Verpackungsplasmide pCMV.VSV-G und Hit60 sowie mit 10 µg des Expressionsplasmids pMx.pie mithilfe von 50 µl 2 M CaCl₂ und 250 µl 2x HBS-Puffer

transfiziert. Nach 12 h wurde das Zellkulturmedium abgenommen und frisches Medium zu den Zellen gegeben. Replikationsdefiziente Virionen wurden von den Phoenix-Zellen synthetisiert und in das Zellkulturmedium abgegeben. Der Kulturüberstand wurde nach 24 und 48 h mit frischem RPMI-Medium in einem Verhältnis von 1 : 2 gemischt und zusammen mit 1 µg / ml Polybrene mit den Zielzellen inkubiert. Polybrene ist ein kationisches Polymer, das sich an die negativ geladene Zellmembran anlagert, die Ladung der Zellmembran neutralisiert und dadurch die Transduktionseffizienz erhöht.

EGFP-positive Zellen wurden von Dr. Abdo Konur (FACS Core Facility, Tumorstudienzentrum (TVZ), Universitätsklinikum Mainz) mit dem Fluoreszenz-assoziierten Zellsorter (BD FACSAria™) isoliert und weiter kultiviert.

2.2.2 Proteinanalytik

2.2.2.1 Gewinnung von Proteinextrakten

Für die Gewinnung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen wurde die Kultur abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und mit NP-40-Lysepuffer für 30 min auf Eis lysiert (Helenius und Simons, 1975). NP-40 ist ein nichtionisches Detergenz, dass die Zellmembran destabilisiert und so die Zellen lysiert. Während der Proteinextraktion wurde die Degradation der Proteine durch Proteasen mithilfe des Protease-Inhibitor-Mix complete (Roche) verhindert, der die Protease-Inhibitoren Chymotrypsin, Thermolysin, Papain, Pronase und Trypsin enthält. Der Abbau der Proteinphosphorylierungen durch Phosphatasen wurde durch die Verwendung des Phosphatase-Inhibitor-Cocktails 1 und 2 (Sigma-Aldrich) reduziert. Die enthaltenen Phosphatase-Inhibitoren Cantharidin, Bromotetramisol, Microcystin LR, Natriumorthovanadat, Natriummolybdat, Natriumtartrate und Imidazol inhibieren verschiedene Phosphatase-Proteinfamilien. Anhand der Proteinphosphorylierungen wurde die Aktivität von Proteinkinasen und anderen zellulären Proteinen, die durch Phosphorylierungen reguliert werden, analysiert.

Die Zellen wurden komplett aufgeschlossen durch das Schockfrieren in -196 °C kaltem, flüssigem Stickstoff. Durch Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand enthält das Gesamtproteingemisch, von dem der Proteingehalt mit der Bradford-Methode (BioRad Protein Assay) photometrisch bei 595 nm bestimmt wurde (Bradford, 1976). Der dabei verwendete Triphenylmethanfarbstoff

Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet Komplexe mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen. Durch diese Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschoben (Compton und Jones, 1985). Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mithilfe der denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Burnette et al., 1981; Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979; Shapiro et al., 1967; Weber et al., 1969; Raymond et al., 1959). 30 – 50 µg der Gesamtproteinextrakte wurden mit 6x SDS-Probenpuffer nach Laemmli gemischt. Dieser Probenpuffer enthält die anionische Detergenz SDS, welche hydrophobe Wechselwirkungen von Proteinen aufhebt, sowie die reduzierende Substanz β-Merkaptoethanol, wodurch die Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstruktur aufgebrochen werden und das zu analysierende Protein in der Primärstruktur vorliegt. Durch die Anlagerung von SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist (Laemmli et al., 1970). Nachdem die Proteinproben für 5 min bei 95 °C denaturiert wurden, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 10 - 15 %igem Polyacrylamidgel.

2.2.2.3 Western Blot

Mit der Western Blot-Technik (Tankblot-System, BioRad) wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran (HybondTM-ECLTM, Amersham Biosciences) transferiert und immobilisiert (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979). Mithilfe der Ponceau S-Färbung wurden reversibel die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine auf der Membran angefärbt, die gleichmäßige Beladung kontrolliert und damit gleichzeitig die Proteine auf der Membran fixiert.

Um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren, wurde die Membran mit 5 % fettfreier Milch und 0,1 % Tween-20 in PBS für 2 h geblockt. Die Expression einzelner Proteine wurde

mithilfe der Immundetektion nachgewiesen, wobei spezifische Primärantikörper an das korrespondierende Protein auf der Membran binden. Dafür wurde die Nitrocellulose-Membran über Nacht bei 4 °C mit einem antigenspezifischen, primären Antikörper (1 : 500 – 1 : 2000 Verdünnung) inkubiert, mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit einem Fc-Fragment-spezifischen, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*)-konjugierten, sekundären Antikörper (ImmunoPure, Pierce) inkubiert. Die HRP katalysiert die Oxidation des Luminol-Derivats ECL (*electrogenerated chemiluminescence*) (SuperSignal® West Pico Substrat, Pierce) in 3-Aminophthalate, das bei 425 nm Licht emittiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem CHEMI-SMART 5100 (Vilber Lourmat) und die Auswertung mit der Software VISION-Capt und Bio1D (Vilber Lourmat).

2.2.2.4 Enzymimmunoassay zum Nachweis von zytosolischem Cytochrom c

Mit dem Enzymimmunoassay ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) können Proteine innerhalb von verschiedenen Extrakten quantitativ bestimmt werden (Engvall et al., 1971; van Weemen et al., 2005). Mit dem ‚Human Cytochrome c ELISA‘ (Bender MedSystems) wurde zytoplasmatisches Cytochrom c anhand der Herstellerangaben nachgewiesen. Dabei wurden die Zellen mittels Digitonin oder Dounce Homogenisator lysiert, dass nur die Zellmembran aufgebrochen wurde, aber die Mitochondrienmembran intakt blieb. Die vollständige Zelllyse wurde mithilfe der Trypanblau-Färbung mikroskopisch kontrolliert.

Das in den zytosolischen Zellextrakten enthaltene Cytochrom c bindet an spezifische Antikörper, die an einer Mikrotiterplatte immobilisiert sind. Der Nachweis und die Quantifizierung des gebundenen Cytochrom c erfolgte mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Nach Zugabe des Peroxidase-Substrates Wasserstoffperoxid oxidieren freierwerdende Protonen das farblose Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Endprodukt. Diese Reaktion wurde mit Schwefelsäure gestoppt und die Bildung des stabilen, gelben Farbkomplex bei 450 nm photometrisch mit dem *Microplate Reader* Model 680 (BioRad) gemessen. Da die Farbintensität proportional zur Proteinkonzentration ist, konnte die vorhandene Menge an Cytochrom c im Zytosol anhand einer Cytochrom c-Standardkurve mit der *Spectrosoft Elisa Plate* Software berechnet werden.

2.2.2.5 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie (IHC) kann die Proteinexpression mithilfe von antigenspezifischen Antikörpern in Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Bei der verwendeten indirekten Methode wurde der Primärantikörper von einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper erkannt. Nach Zugabe des Peroxidase-Substrates Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kommt es zu einer Braunfärbung der Antikörper-gebundenen Strukturen im Gewebeschnitt. Um die Histologie in den Tumorschnitten auswerten zu können, wurde die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin verwendet. Hämatoxylin färbt alle Zellkerne dunkelblau, während Eosin die kationischen und eosinophilen Strukturen, wie z.B. Proteine im Zytoplasma, hellrosa anfärbt. Färbung und Auswertung erfolgten durch Dr. Florian Grabellus (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen).

2.2.2.6 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich Einzelzellen innerhalb einer Zellsuspension zu identifizieren, quantifizieren und zu sortieren (Gohde und Dittrich, 1971). Häufige Anwendungen sind die Untersuchung der Expression von Zelloberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die durchflusszytometrische Analyse von Zellzyklus und Apoptose erfolgte mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen.

Mittels hydrodynamischer Fokussierung werden einzelne Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt und ein Detektor misst die Wellenlänge und Intensität der Fluoreszenz. Damit kann man Aussagen über die Art und Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe und der Antikörper-markierten Zelloberflächenmoleküle machen. Zeitgleich werden Lichtbeugungseffekte (FSC, *forward scatter*), ein Maß für die Zellgröße, und Lichtstreuungseffekte (SSC, *sideways scatter*), ein Maß für die Granularität der Zelle, gemessen (Kruzik und Nolan, 2006).

Für die Bestimmung der Expression von Zelloberflächenproteinen wurden 1×10^6 Zellen in PBS mit 40 µg Primärantikörper für 15 min bei RT inkubiert und mit PBS gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen für 30 min auf Eis mit 20 µg fluoreszenzmarkiertem

Sekundärantikörper gefärbt, gewaschen und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*), als Maß für die Proteinexpression, ausgewertet.

Für die Analyse des Zellzyklus wurden die Zellen aus der Kultur abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und mit 500 µl HFS (*hypotonic fluorescence solution*)-Puffer für 30 min auf Eis gefärbt (Nicoletti et al., 1991). Anhand des Zellzyklusprofils wurde die Anzahl der Zellen mit fragmentierter DNA (sub-G1-Fraktion) als Apoptosemarker bestimmt und mit dem Zelltod verglichen. Für die Zelltodmessung wurden die Zellen mit 0,2 µg / ml Propidiumiodid in PBS auf Eis für 10 min gefärbt und im Fluoreszenzkanal FL2 des Durchflusszytometers analysiert. Die Aktivität der Caspasen während der Apoptosekaskade wurde mit dem ‚Caspase detection kit (FITC-VAD-FMK)‘ (Oncogene) bestimmt. Dabei bindet das Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte, zellpermeable Caspasensubstrat VADfmk (Val-Ala-Asp-[O-methyl]-fluoromethyl-ke-ton) irreversibel an aktivierte Caspasen in apoptotischen Zellen und die Caspasenaktivität konnte anhand der FITC-Färbung der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dafür wurden 1×10^6 Zellen in 300 µl Medium mit 1 µl FITC-VADfmk für 1 h bei 37°C inkubiert, mit Waschpuffer gewaschen und im FL1-Kanal des Durchflusszytometers analysiert. Die Intensität der grünen Fluoreszenz korreliert mit der Caspasenaktivität und der Apoptoseinduktion.

Ein Merkmal der intrinsischen Apoptose ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran (Green und Kroemer, 2004; Spierings et al., 2005; Ow et al., 2008; Riedl und Salvesen, 2007). Um das nachzuweisen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminethylenester (TMRE) verwendet, der sich in die intakte Mitochondrienmembran elektrostatisch einlagert. Kommt es zur Initiation des intrinsischen Apoptosesignalwegs mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, kann sich TMRE nicht mehr in die Membran einlagern und die Zellen werden TMRE-negativ. Für diese Analysen wurden die Zellen in der Kultur mit 50 nM TMRE 30 min bei 37 °C inkubiert, mit PBS gewaschen und im Kanal FL2 durchflusszytometrisch bestimmt.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson), die Auswertung mit der FACSDiva™ v6, CellQuest Pro (Becton Dickinson) oder der FlowJo Software. Die Berechnung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit den Programmen Exel (Microsoft Office) und GraphPad Prism 4.

2.2.2.7 Enzymatischer Nachweis der Caspasenaktivität

Die funktionelle Aktivität von katalytisch aktiven Enzymen kann photometrisch über den Substratumsatz bestimmt werden. Für die Messung der Caspase-3-Aktivität in zytosolischen Zellextrakten wurde das ‚Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit‘ (Calbiochem) verwendet. Dafür wurden die Zellen für 30 min auf Eis mit dem CEB (*cytoplasmic extraction buffer*)-Puffer lysiert, die Zelltrümmer für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand mit der Bradford-Methode (siehe Kapitel 2.2.2.1) bestimmt. 20 µg Proteinextrakt wurden mit 2 mM des kolorimetrischen Caspase-3-Substrates Ac-DEVD-pNA (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid) versetzt und der Farbumschlag, der proportional zur Caspase-3-Aktivität ist, bei 405 nm alle 5 min für 2 h im Microplate Reader Model 680 (BioRad) photometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Microplate Manager 5.2.1 Software.

2.2.3 Kultivierung und Behandlung der humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien *in vitro*

2.2.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung von Suspensionszellen (B-NHL-Zelllinien) und adhärenenten Zellen (Phoenix) (siehe 2.1.10) erfolgte bei 37 °C mit 5 % CO₂ in einem CO₂-Inkubator (Binder). Den Zellkulturmedien RPMI-1640, IMDM, α-MEM oder DMEM (Gibco, Sigma, Lonza) wurde 10 % fötales Kälberserum (FKS, Gibco), 1 % L-Glutamin (200 nM, Gibco) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Gibco) zugesetzt. Die Zusammensetzung der Kulturmedien und die Kultivierungsbedingungen erfolgten nach den Angaben der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig).

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen aus der Kultur mit 0,1 %igem Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Mit der Trypanblau-Färbung können lebende von toten Zellen unterschieden werden, da Trypanblau durch defekte Zellmembranen toter Zellen diffundiert, an die Proteine im Zytosol bindet und die toten Zellen blau angefärbt.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen für 5 min bei 1.400 rpm abzentrifugiert und in FKS mit 10 % DMSO bei -80 °C weggefroren. Die Langzeitlagerung erfolgt bei -196 °C in einem N₂-Tank-System (Consarctic).

2.2.3.2 Behandlung der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit Rituximab *in vitro*

Die B-NHL-Zelllinien wurden mit einer Zellzahl von $0,2 \times 10^6$ Zellen / ml für 12 - 72 h mit 10 µg / ml monomerem oder quervernetztem Rituximab behandelt. Die Quervernetzung von Rituximab erfolgte durch die gleichzeitige Zugabe von 25 µg / ml eines sekundären, anti-human Immunglobulin-F(ab')₂-Fragments. Als IgG1-Isotypkontrolle wurde der therapeutische Antikörper Cetuximab, ein anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Antikörper, verwendet.

2.2.3.3 Analyse der Rituximab-induzierten antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität *in vitro*

Für die Bestimmung der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) wurden die B-NHL-Zellen mit 10 µg / ml Rituximab behandelt und für 12 h mit peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) in einem Verhältnis von 1 : 10 kokultiviert (van Meerten et al., 2006). In den PBMC sind ca. 10 % natürliche Killerzellen (NK) enthalten, die vor allem für die Induktion der ADCC verantwortlich sind.

Die Isolation der PBMC erfolgte aus Vollblut von gesunden Spendern (Transfusionszentrale, Universitätsklinikum Mainz) mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll ist ein hydrophiles Polysaccharid und wird für die Trennung von Blutbestandteilen verwendet. Das Vollblut wurde 1 : 2 mit PBS verdünnt und 20 ml Ficoll-Hypaque (Gibco) mit 20 ml Blutzellsuspension überschichtet. Anschließend wurde für 20 min bei 1400 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die PBMC zwischen der unteren Schicht aus Ficoll, Erythrozyten und Granulozyten und der oberen Serumschicht. Die Interphase mit den PBMC wurde abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und restliche Erythrozyten für

5 min auf Eis mit dem Ammoniumchlorid-Puffer lysiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die PBMC in FKS mit 10 % DMSO bei -80 °C weggefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte im N₂-Tank bei -196 °C.

Damit die PBMC von den B-NHL im Durchflusszytometer unterschieden werden konnten, wurden die PBMC mit 1 µM CFDA-AM (5-Carboxyfluoresceindiacetat-Acetoxymethylester) für 10 min bei 37 °C gefärbt. CFDA-AM ist ein nicht fluoreszierender Farbstoff, der in Zellen diffundiert und dort von unspezifischen, zytosolischen Esterasen in den fluoreszierenden Farbstoff 5-Carboxyfluorescein gespalten wird.

Für die Bestimmung der Rituximab-induzierten ADCC wurde die Kokultur aus Rituximab-behandelten B-NHL und PBMC mit Propidiumiodid gefärbt und am Durchflusszytometer die lysierten B-NHL-Zellen nachgewiesen. Dafür wurde die Anzahl der PI-positiven Zellen innerhalb der CFDA-negativen B-NHL-Zellpopulation bestimmt. Als Kontrolle wurde die unspezifische Lyse der B-NHL-Zellen durch die PBMC bestimmt. Dafür wurden die B-NHL-Zellen mit den PBMC ohne Rituximab kokultiviert (unspezifische ADCC). Die Berechnung der Rituximab-induzierten ADCC erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{spezifische R-ADCC [\%]} = (\text{R-ADCC} / \text{unspezifische ADCC}) \times 100.$$

2.2.3.4 Analyse der Rituximab-induzierten komplementvermittelten Zytotoxizität *in vitro*

Für die Analyse der komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) wurden die B-NHL-Zellen für 4 h mit Rituximab in Anwesenheit von 5 % humanem Blutserum inkubiert. Die Messung der CDC erfolgte mit PI-Färbung am Durchflusszytometer.

Das humane Serum wurde nach 60 min Gerinnung aus Vollblut von einem gesunden Spender gewonnen. Indem die zellulären Blutbestandteile für 20 min bei 900 rpm abzentrifugiert wurden. Die Lagerung des humanen Serums erfolgte bei -80 °C (Cragg et al., 2003; van Meerten et al., 2006).

2.2.4 Untersuchung der direkten Rituximab-Wirkung in einem humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Xenotransplantationsmodell *in vivo*

2.2.4.1 NOD/SCID-Mausmodell

Um die Rolle der direkten Wirkungen von Rituximab und die Funktion der identifizierten Resistenzfaktoren *in vivo* zu testen, wurde ein humanes B-NHL-Xenotransplantationsmodell in immuninkompetenten NOD/SCID (*non-obese diabetic / severe combined immunodeficiency*, NOD.CB-17-*Prkdc*^{scid})-Mäusen etabliert. Eine Mutation innerhalb des Gens der DNA-Proteinkinase *Prkdc* (*protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*), die an der DNA-Reparatur beteiligt ist, führt zu einem Defekt der V(D)J-Rekombination der T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulin-Gene (Bosma et al., 1988). Deshalb besitzen diese Mäuse keine funktionellen T- und B-Lymphozyten. Außerdem zeigen sie eine verminderte NK-Zell-Aktivität und Defekte im Komplementsystem (Baxter und Cooke, 1993; Shultz et al., 1995; Tang et al., 2008). Um restliche Immunzellen zu reduzieren wurden die Mäuse einen Tag vor Versuchsbeginn mit 150 rad sublethal bestrahlt.

Die Zucht der NOD/SCID-Mäuse und die Kontrolle des genetischen Hintergrundes erfolgten durch die zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE) des Universitätsklinikums Mainz unter Leitung von Dr. Reifenberg. Die durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Az. 1.5 177–07/051–54) (Projektleiter: Prof. Dr. M. Schuler, Dr. P. Hähnel) genehmigt und orientierten sich an den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).

2.2.4.2 Humanes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Xenotransplantationsmodell

Die Etablierung des humanen B-NHL-Xenotransplantationsmodells in NOD/SCID-Mäusen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Patricia Hähnel (Innere Klinik/Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen). Dafür wurden 8 – 12 Wochen alte, männliche NOD/SCID-Mäuse 24 h vor Versuchsbeginn sublethal mit 150 rad bestrahlt, um restliche Immunzellen zu reduzieren. 10×10^6 Zellen der B-NHL-Zelllinie Ramos oder HT wurden jeweils in 50 µl PBS intravenös (i.v.) in die Schwanzvene appliziert und die Lymphomausbreitung und das Überleben der NOD/SCID-Mäuse bestimmt (Schmidtwolf et al., 1991; Ghetie et al., 1990; Ghetie et al., 1992; Hong et al., 1992; Itoh et al., 1993; Dekroon et al., 1994). Endpunkt des

Versuches waren Symptome von fortschreitender B-NHL-Ausbreitung, wie z.B. rapider Gewichtsverlust ($> 10\%$) oder Lähmungserscheinungen der Hinterbeine aufgrund von Lymphominfiltration in das Rückenmark. Die Auswertung der Überlebenskurven erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzer und die Bestimmung des Signifikanzniveaus (p-Wertes) mit dem Log-Rank/Mantel-Cox-Test mithilfe der GraphPad Prism 4 Software (Kaplan und Meier, 1958; Mantel, 1966; Peto und Peto, 1972).

Um die Lokalisation und Ausbreitung der humanen B-NHL-Zellen in den NOD/SCID-Mäusen zu untersuchen, wurden Organe mit möglicher Lymphominfiltration, wie z.B. der Milz, Lymphknoten, Leber, Niere, Lunge, Knochenmark und Gehirn, entnommen und histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung sowie immunhistochemisch auf die Expression von humanem CD20 und dem Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Die Immunhistochemie und histologische Auswertung erfolgte durch Dr. Florian Grabellus (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen).

2.2.4.3 Rituximab-Behandlung *in vivo*

Um die direkten Wirkungen von Rituximab *in vivo* zu untersuchen, wurden 10×10^6 B-NHL-Zellen in NOD/SCID-Mäusen xenotransplantiert (siehe Kapitel 2.2.4.2). Nach 5 Tagen wurden die NOD/SCID-Mäuse intraperitoneal (i.p.) mit 20 mg / kg Körpergewicht (KG) Rituximab oder Cetuximab als IgG1-Isotypkontrolle behandelt und das Gesamtüberleben der Mäuse verglichen (Bertolini et al., 2000; Di Gaetano et al., 2003; Hernandez-Ilizaliturri et al., 2003; Cragg und Glennie, 2004). Das Behandlungsschema bestand aus einer täglichen Rituximab-Injektion von Tag 5 bis 10 und anschließend zweimal pro Woche bis zum Ende des Versuches (Abb. 2.1).

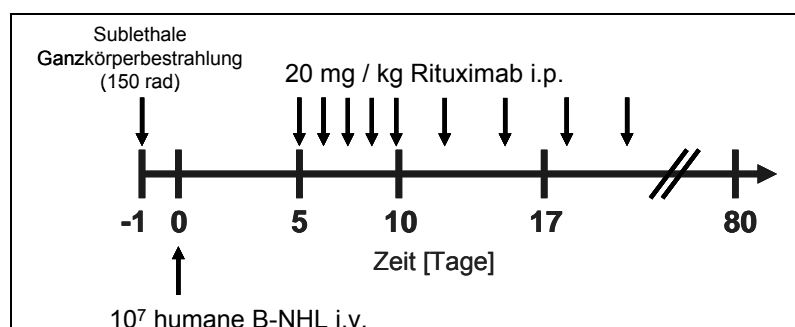


Abbildung 2.1 Rituximab-Behandlungsschema der mit humanen B-NHL-xenotransplantierten NOD/SCID-Mäusen. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die NOD/SCID-Mäuse sublethal mit 150 rad bestrahlt. Von den humanen B-NHL-Zellen wurden 10^7 Zellen i.v. injiziert und von Tag 5 bis 10 täglich sowie bis zum Versuchende zweimal wöchentlich mit 20 mg / kg Rituximab i.p. behandelt.

Um die Effektivität der Kombinationstherapie von Rituximab mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 *in vivo* zu untersuchen, wurde die Rituximab-resistente B-NHL-Zelllinie HT in die NOD/SCID-Mäuse xenotransplantiert und mit 20 mg / kg Rituximab in Kombination mit 20 mg / kg LY294002 i.p. behandelt (Hu et al., 2000; Semba et al., 2002; Fan et al., 2003; Martelli et al., 2006). Das LY294002 wurde in PBS mit 10 % DMSO gelöst. Deshalb wurden drei NOD/SCID-Mäuse als Kontrolle mit 10 % DMSO in PBS i.p. behandelt, um eine Wirkung des Lösungsmittels auszuschließen. Alle Kontroll- und Behandlungsgruppen bestanden aus 5 – 10 Mäuse pro Gruppe.

2.2.5 Immunohistochemische Untersuchung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Patientenproben

Die *in vitro* identifizierten und *in vivo* bestätigten Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab wurden anhand von primärem Biopsiematerial von B-NHL-Patienten, die mit einer Rituximab-Kombinationstherapie behandelt wurden, untersucht (Weide et al., 2007; Buske C, 2008). In Zusammenarbeit mit Dr. habil. Georg Heß (III. Medizinische Klinik, Universität Mainz) wurden die Rückenmark- und Lymphknotenbiopsien von B-NHL-Patienten mit indolenten oder aggressiven B-NHL in 4 Gruppen unterteilt. Die Einteilung erfolgte anhand des Therapieverlaufs der Patienten. Dabei wurde unterteilt, inwieweit die Patienten auf die Rituximab-Therapie angesprochen haben. Unterschieden wurde zwischen gutem Ansprechen auf die Rituximab-haltige Therapie (Remission) und schlechtem Ansprechen in Zusammenhang mit erneutem Ausbruch des B-NHL (Rezidiv). Jede der vier Gruppen bestanden aus 5 - 10 Patienten. Die Patientenproben stammen aus einer klinischen Studie (Hess et al., 2006), die von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt wurde. Alle Patienten wurden nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (1964, 6. Überarbeitung 2008) informiert und waren mit der weiteren wissenschaftlichen Untersuchung der Biopsieproben einverstanden.

Die Proteinexpression von möglichen Resistenzfaktoren wurde immunhistochemisch basierend auf der Lymphomaggressivität und dem Therapieansprechen ausgewertet und verglichen. Die immunhistochemische Analyse der Proteinexpression innerhalb des Biopsiematerials erfolgte anhand des IHC-Scores nach Remmele von 0 (keine Expression) bis 4 (starke Expression) durch Dr. Florian Gräbells (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen) (Remmele und Stegner, 1987).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Rituximab-induzierten Zelltodes in humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien *in vitro*

3.1.1 Vergleich des Rituximab-induzierten Zelltodes durch direkte und indirekte Wirkmechanismen

Um zu überprüfen, ob der therapeutische anti-CD20-Antikörper Rituximab nach Bindung an CD20-positive B-NHL direkt Apoptose induziert, wurden die B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ramos, WSU-NHL, Jeko-1, HT und Sc-1 mit monomerem Rituximab (10 µg / ml) behandelt. Die Apoptoseinduktion von Rituximab wurde verstärkt, indem dieser mit einem sekundären, anti-human Immunoglobulin-F(ab')₂-Fragment (25 µg / ml) quervernetzt wurde. Als Kontrolle diente die Behandlung mit dem anti-human Immunoglobulin-F(ab')₂-Fragment alleine sowie die IgG1-Isotypkontrolle mit quervernetztem anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Antikörper Cetuximab (10 µg / ml). Nach 48 h Behandlung wurde der Zelltod anhand der Propidiumiodid (PI)-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.1).

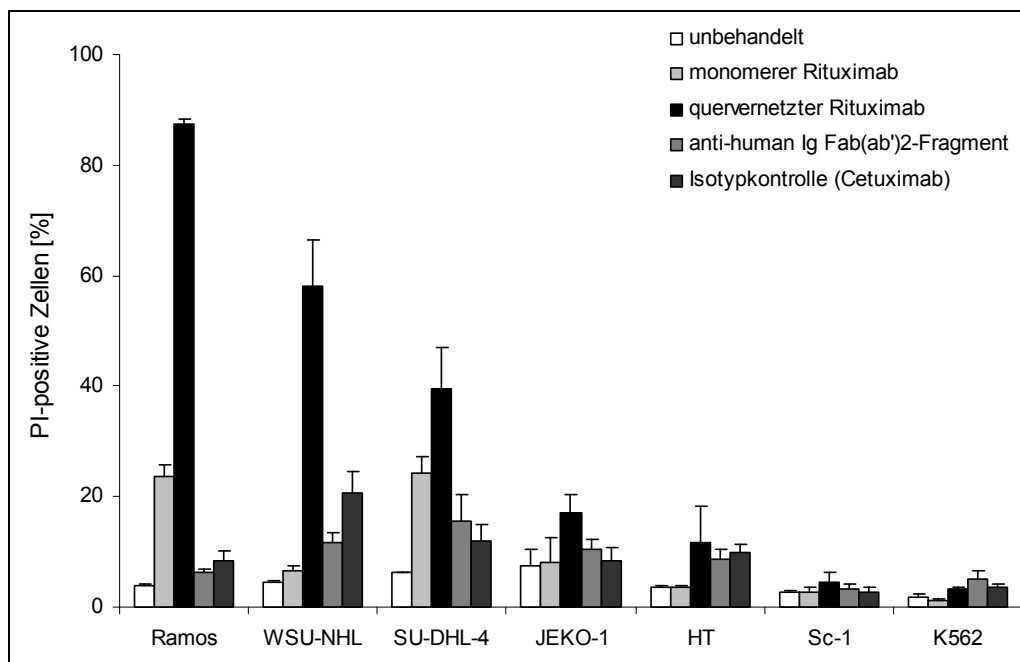


Abbildung 3.1 Rituximab-induzierter Zelltod in B-NHL-Zelllinien. Sechs B-NHL-Zelllinien und die CD20-negative Kontrolle K562 wurden 48 h mit monomerem und quervernetztem Rituximab behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit sekundärem F(ab')₂-Fragment alleine sowie die IgG1-Isotypkontrolle mit Cetuximab. Der Zelltod wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Die Bestimmung der Sensitivität gegenüber Rituximab zeigte, dass die B-NHL-Zelllinien Ramos, WSU-NHL und SU-DHL-4 sensitiv gegenüber der Behandlung mit Rituximab reagierten. Dagegen waren die Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 resistent. Die CD20-negative Zelllinie K562 wurde als Negativkontrolle verwendet.

Um den beobachteten Rituximab-resistenten Phänotyp weiter zu untersuchen, wurde die Apoptoseinduktion durch quervernetzten Rituximab in weiteren B-NHL-Zelllinien unterschiedlicher histologischer Subtypen getestet. Nach 48 h Behandlung mit quervernetztem Rituximab wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch anhand der Messung von Zellen mit fragmentierter DNA (Sub-G1-Fraktion) bestimmt (Abb. 3.2).

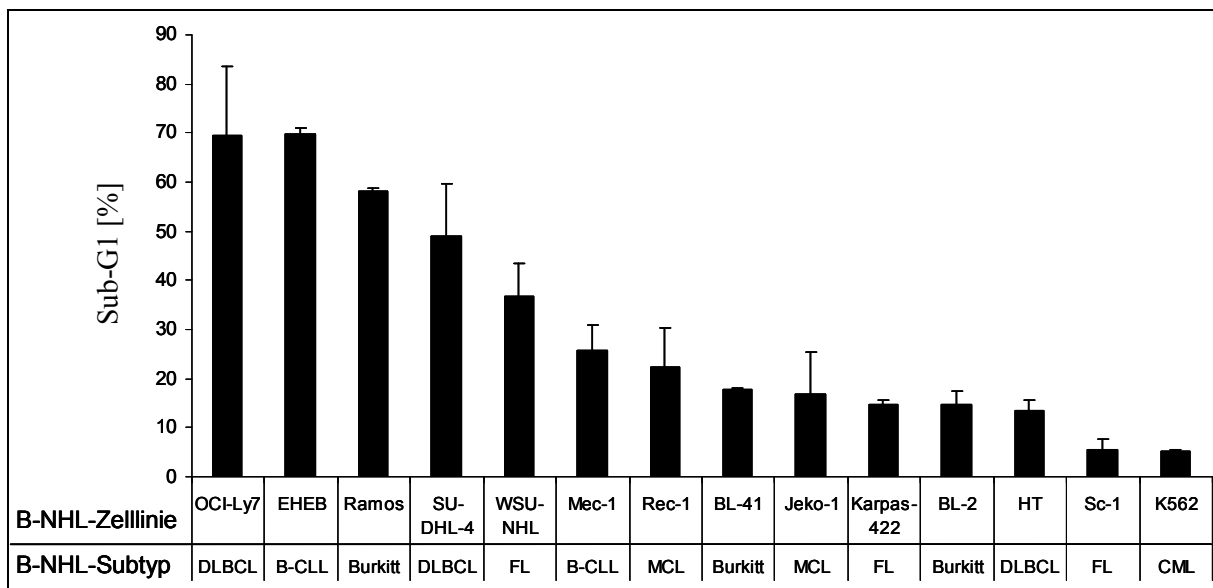


Abbildung 3.2 Direkte Apoptoseinduktion durch Rituximab. Dreizehn B-NHL-Zelllinien mit unterschiedlichem B-NHL-Subtyp sowie die CD20-negative Kontroll-Zelllinie K562 wurden mit quervernetztem Rituximab für 48 h behandelt und der Anteil apoptotischer Zellen anhand der Sub-G1-Fraktion durchflusszytometrisch bestimmt. Sieben der dreizehn untersuchten B-NHL-Zellen zeigten einen Rituximab-sensitiven Phänotyp, während die anderen sechs B-NHL-Zelllinien mit weniger als 20 % Sub-G1 resistenter gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose sind. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Erneut zeigten sieben der dreizehn mit Rituximab-behandelten B-NHL-Zelllinien einen Rituximab-sensitiven (53,8 %) und sechs einen Rituximab-resistenten Phänotyp. Eine B-NHL-Zelllinie wurde als resistent gegenüber Rituximab-Behandlung eingeordnet, wenn die Apoptoseinduktion durch quervernetzten Rituximab nach 48 h geringer als 20 % war. Damit wurden als Rituximab-sensitiv die B-NHL-Zelllinien OCI-Ly7, EHEB, Ramos, SU-DHL-4, WSU-NHL, Mec-1 und Rec-1 eingeordnet. Resistent gegenüber der Behandlung mit

Rituximab *in vitro* waren die Zelllinien Jeko-1, Karpas-422, BL-2, HT und Sc-1. Allerdings ist der Übergang zwischen Rituximab-sensitiven und -resistenten B-NHL-Zellen fließend.

Da die verwendeten B-NHL-Zelllinien unterschiedliche B-NHL-Subtypen repräsentieren, konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Resistenz gegenüber Rituximab unabhängig vom histologischen Lymphomsubtyp oder der Aggressivität der B-NHL war.

Um aufzuklären, ob der beobachtete Rituximab-resistente Phänotyp bei der direkten Induktion von Apoptose mit den indirekten Wirkmechanismen, der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) und komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC), korreliert, wurde die Rituximab-induzierte Apoptose mit dem Zelltod durch ADCC und CDC verglichen. Die Messung der ADCC erfolgte durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung nach 12 h Kokultur der B-NHL-Zellen mit Rituximab (10 µg / ml) und PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) in einem Verhältnis von 1 : 10. Für die Induktion der CDC wurden die B-NHL-Zelllinien 4 h zusammen mit Rituximab (10 µg / ml) und 5 % humanem Serum inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch nach PI-Färbung (Abb. 3.3).

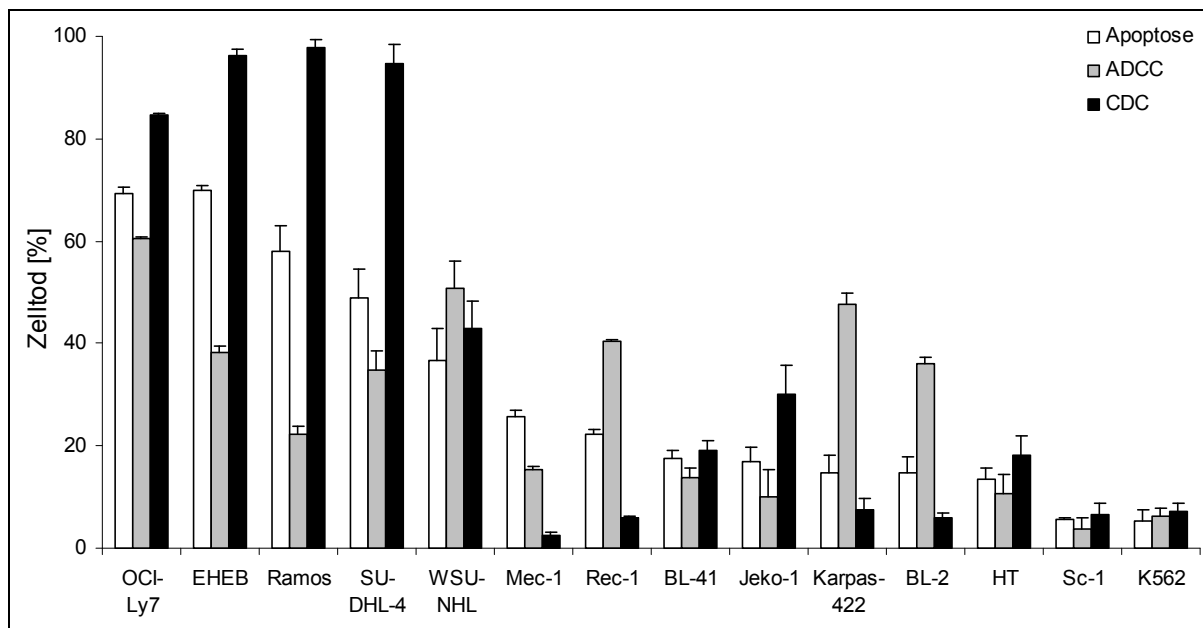


Abbildung 3.3 Vergleich der direkten Induktion von Apoptose durch Rituximab mit den indirekten Wirkmechanismen CDC und ADCC. Für die Induktion von Rituximab-induzierter Apoptose wurden die Rituximab-sensitiven und -resistenten B-NHL-Zelllinien 48 h mit quervernetztem Rituximab behandelt und die Sub-G1-Fraktion durchflusszytometrisch bestimmt. Die Rituximab-induzierte ADCC wurde nach 12 h Kokultur mit PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung ermittelt. Für die Induktion der Rituximab-vermittelten Komplementlyse (CDC) wurden die B-NHL-Zelllinien 4 h mit Rituximab in Kombination mit 5 % humanem Serum inkubiert und die Zelllyse nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Bei dem Vergleich der Rituximab-induzierten Apoptose mit der ADCC und CDC zeigte sich, dass der Rituximab-resistente Phänotyp der B-NHL-Zelllinien bei der direkten Induktion von Apoptose auch mit der Sensitivität gegenüber CDC und teilweise mit der ADCC korreliert. Um auszuschließen, dass die Rituximab-Resistenz auf einer geringeren Zelloberflächenexpression des CD20-Zielantigens basiert, wurde die CD20-Expression in den B-NHL-Zelllinien durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.4).

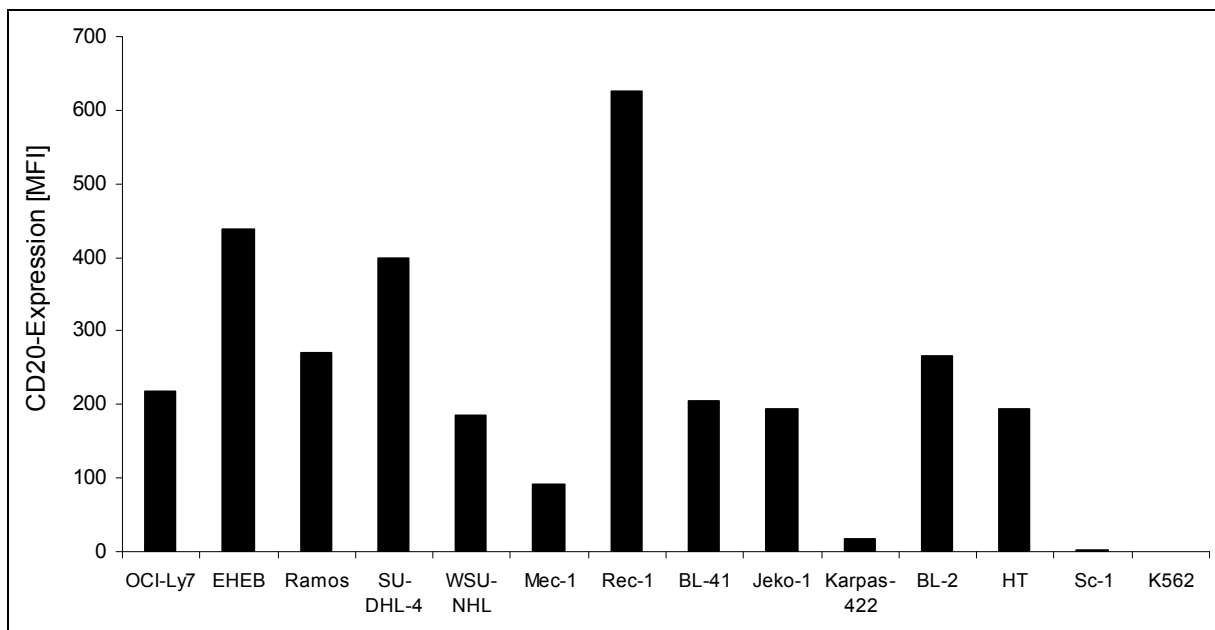


Abbildung 3.4 Expression von CD20 auf der Zelloberfläche der B-NHL-Zelllinien (MFI, *mean fluorescence intensity*). Unbehandelte B-NHL-Zelllinien wurden mit einem FITC-markierten anti-human CD20-Antikörper gefärbt und die CD20-Expression mit der Sensitivität gegenüber Rituximab verglichen.

Es zeigte sich, dass die Sensitivität der B-NHL-Zelllinien gegenüber Rituximab-Behandlung nicht mit der CD20-Expression korreliert.

3.1.2 Charakterisierung des Rituximab-induzierten Apoptosesignalwegs

3.1.2.1 Rituximab-induzierte, apoptotische DNA-Fragmentierung

Die späte Phase der Apoptosekaskade ist charakterisiert durch die Aktivierung von Effektorcaspasen. Diese Proteasen spalten die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat verschiedener zellulärer Komponenten, wie z.B. der Laminine der Zellkernmembran oder den Inhibitor der DNase CAD (ICAD, *caspase-activated DNase*). Die Spaltung dieser Proteine führt unter anderem zur Degradation des Zytoskeletts, zur DNA-Fragmentierung und zur Bildung von apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*) (Lamkanfi et al., 2007). Die apoptotische DNA-Fragmentierung wurde anhand der Sub-G1-Fraktion im Zellzyklusprofil durchflusszytometrisch quantifiziert.

Um die Induktion von Apoptose durch Rituximab besser charakterisieren zu können, wurde als Kontrolle der Breitspektrumproteinkinase-Inhibitor Staurosporin verwendet, der Apoptose über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg induziert (Bertrand et al., 1994; Karaman et al., 2008). Zum Vergleich der Apoptoseinduktion wurden die Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien Ramos, SU-DHL-4 und WSU-NHL sowie die Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 48 h mit quervernetztem Rituximab sowie mit Staurosporin (50 nM, 24 h) behandelt und die apoptotische DNA-Fragmentierung anhand der Sub-G1-Fraktion durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.5).

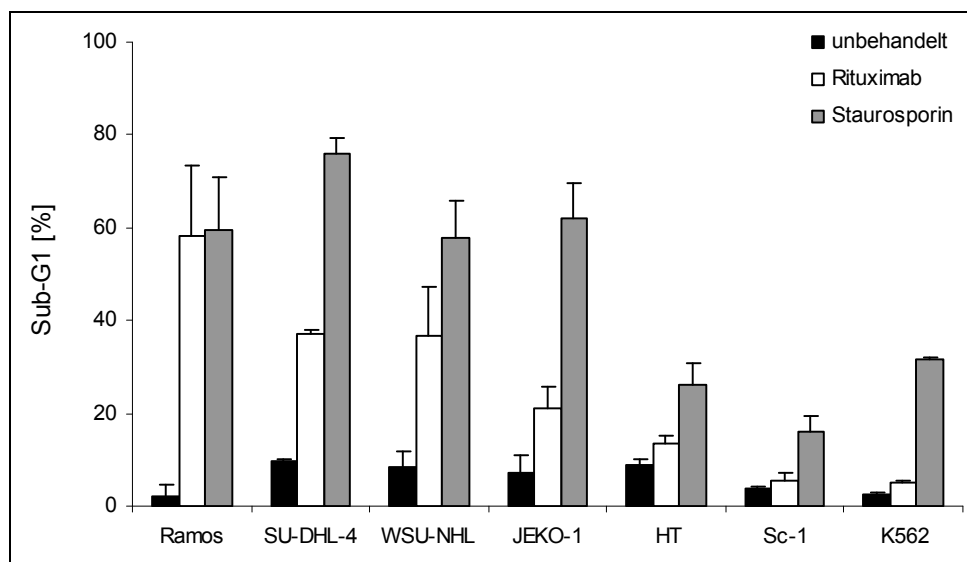


Abbildung 3.5 Vergleich der Induktion von intrinsischer, mitochondrialer Apoptose durch Rituximab mit dem Pan-Kinaseinhibitor Staurosporin. Für die Induktion der Apoptose durch Rituximab wurden die Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien Ramos, SU-DHL-4 und WSU-NHL sowie die Rituximab-resistenten Jeko-1, HT und Sc-1 48 h mit quervernetztem Rituximab behandelt. Zum Vergleich der Apoptoseinduktion wurden sie außerdem für 24 h mit 50 nM Staurosporin behandelt, das Zelltod über den intrinsischen Apoptosesignalweg induziert. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Es zeigte sich, dass die Rituximab-Sensitivität der untersuchten B-NHL-Zelllinien teilweise mit der Sensitivität gegenüber der Staurosporin-induzierten Apoptose korrelierte. Das könnte bedeuten, dass die Rituximab-Resistenz auf einer primären, zellintrinsic Resistenzen gegenüber der intrinsischen Apoptose beruht. Weiter wurde die beobachtete, intrinsische Apoptoseresistenz und der Mechanismus der Apoptoseinhibition genauer charakterisiert.

3.1.2.2 Rituximab-induzierte Caspasenaktivierung

Die Caspasekaskade, bei der inaktive Proformen der Initiator- (Caspase-8, -9) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) in ihre aktive Form gespalten werden, ist ein zentraler und essentieller Schritt innerhalb der apoptotischen Signaltransduktion (Lamkanfi et al., 2007; Kumar, 2007). Um nachzuweisen, dass Rituximab Apoptose über Aktivierung von Caspasen induziert, wurden die B-NHL-Zelllinien 24 h mit monomerem und quervernetztem Rituximab behandelt und die aktivierten Caspasen anhand des fluoreszenzmarkierten Caspasensubstrates FITC-VADfmk durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.6).

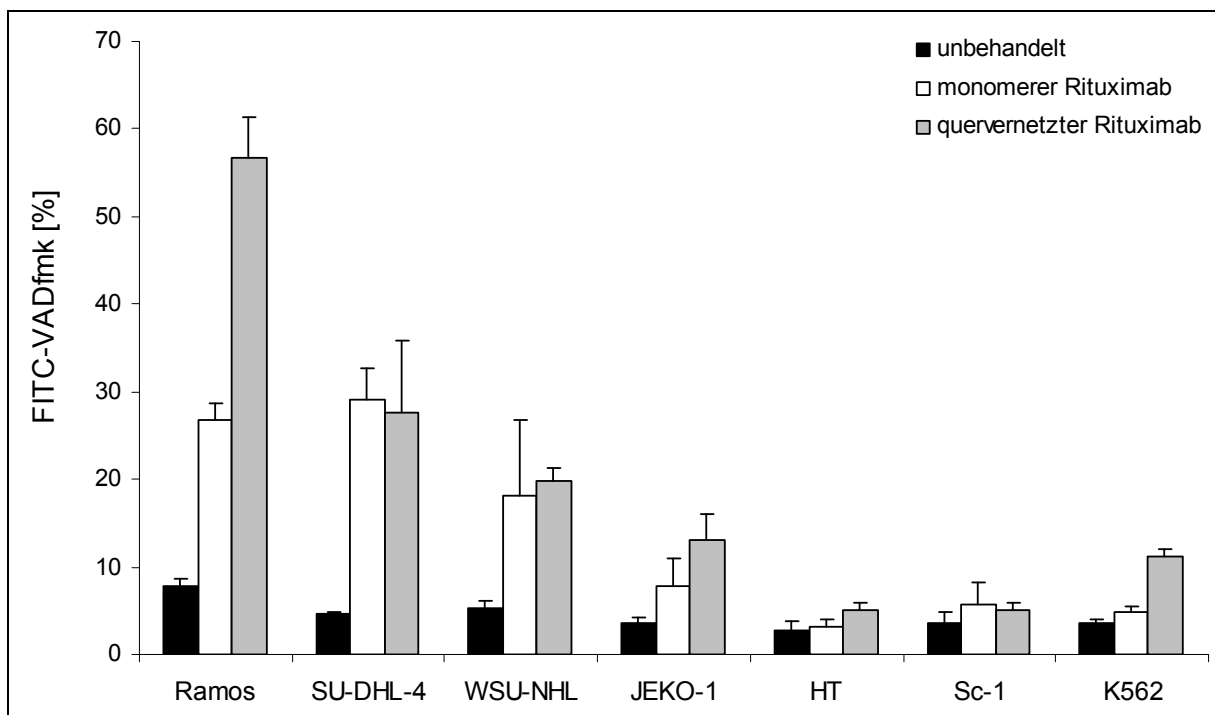


Abbildung 3.6 Caspasenaktivierung durch Rituximab in sensiblen und resistenten B-NHL-Zellen. Nach 24 h Behandlung der B-NHL-Zellen mit monomerem und quervernetztem Rituximab wurde die Aktivierung von Caspasen mithilfe des fluoreszenzmarkierten Caspasensubstrates FITC-VADfmk durchflusszytometrisch bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Eine deutliche Aktivierung der Caspasen erfolgte durch Rituximab nur in den sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos, bei denen auch der Zelltod durch Rituximab auslösbar war. In den resistenten B-NHL-Zelllinien HT und Sc-1 kam es dagegen nicht zur Caspasenaktivierung durch Rituximab. Das zeigte, dass die Caspasen bei der Rituximab-vermittelten Apoptose aktiviert wurden und für die charakteristische DNA-Fragmentierung verantwortlich waren.

Um die Bedeutung der Caspasen bei der Rituximab-induzierten Apoptose zu bestätigen, wurden die Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ramos und WSU-NHL 48 h mit Rituximab in Kombination mit dem zellpermeablen, irreversiblen Pan-Caspaseninhibitor zVADfmk (50 μ M) behandelt. Aufgrund der Inhibition der Caspasen durch zVADfmk kam es zu einer Verringerung der apoptotischen DNA-Fragmentierung durch Rituximab (Abb. 3.7A). Dieses Ergebnis zeigte, dass durch Inhibition von Caspasen die Rituximab-induzierte Apoptose in den B-NHL-Zellen verhindert werden konnte und bestätigte die Aktivierung der Caspasen während der Rituximab-induzierten Apoptose.

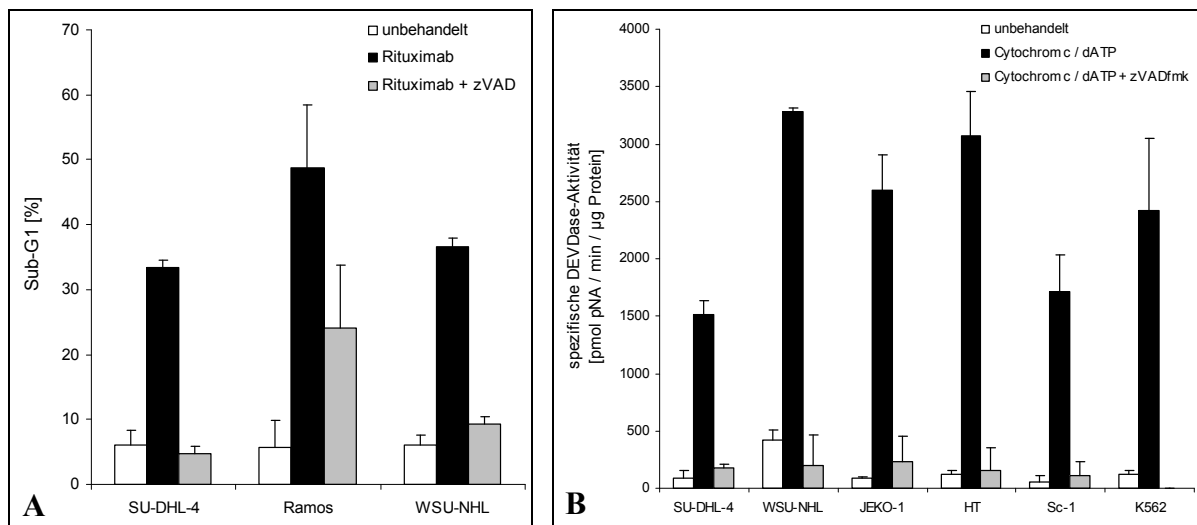


Abbildung 3.7 Inhibition der apoptotischen DNA-Fragmentierung durch den Pan-Caspaseninhibitor zVADfmk (A) und Vergleich der Caspasenaktivierung in den B-NHL-Zelllinien (B). (A) Der Nachweis des Caspasen-abhängigen Zelltodes durch Rituximab-Behandlung erfolgte durch die Behandlung der sensitiven B-NHL-Zellen Su-DHL-4, Ramos und WSU-NHL für 48 h mit quervernetztem Rituximab und gleichzeitiger Inhibition der Caspasen mit 50 μ M des Pan-Caspaseninhibitors zVADfmk. (B) In Zellextrakten der Rituximab-sensitiven und -resistenten B-NHL-Zelllinien wurde Caspase-3 mittels Cytochrom c- und dATP-Behandlung aktiviert und die Caspase-3 (DEVDase)-Aktivität photometrisch mithilfe des kolorimetrischen Caspasensubstrates Ac-DEVD-pNA analysiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Caspasenaktivierung wurden diese mit dem Pan-Caspaseninhibitor zVADfmk wiederum inhibiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Die Analyse der Rituximab-induzierten Caspasenaktivierung wurde bestätigt durch die Hemmung der Rituximab-induzierten, apoptotischen DNA-Fragmentierung mit dem Pan-Caspaseninhibitor zVADfmk. Damit konnte gezeigt werden, dass Rituximab Apoptose über den klassischen Weg der Caspasenaktivierung induziert.

Da bei den resistenten B-NHL-Zellen keine Caspasenaktivierung durch Rituximab beobachtet werden konnte, sollten zur weiteren Charakterisierung der Apoptoseresistenz Caspasendefekte überprüft werden. Durch die induzierte Aktivierung der Caspase-3 mittels Cytochrom c und dATP in den B-NHL-Zellextrakten und die photometrische Analyse der Umsetzung des kolorimetrischen Caspase-3-Substrates Ac-DEVD-pNA wurde die maximal mögliche Aktivierung der Caspase-3 in den B-NHL-Zellen bestimmt (Abb. 3.7B).

Die Bestimmung der maximalen Caspase-3-Aktivität in den B-NHL-Zelllinien zeigte, dass die Aktivierbarkeit der Caspasen in den untersuchten Zelllinien vergleichbar ist und in den Rituximab-resistenten Zellen offensichtlich keine Caspasendefekte vorliegen. Die Inhibition der Apoptose in den resistenten B-NHL-Zelllinien sollte somit in einem früheren Signalschritt der Apoptosekaskade erfolgen.

3.1.2.3 Rituximab-induzierte Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma

Bei der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose kommt es zu einer Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran durch Homo- und Heterodimerisierung der Proteine Bak und Bax und dadurch zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma. Dies ist Voraussetzung für die Formierung des Apoptosom-Komplexes bestehend aus Cytochrom c, Caspase-9 und dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1), der für die Aktivierung der Caspase-9 essentiell ist. Die Initiatorcaspase-9 aktiviert darauf folgend die Effektorcaspase-3 (Green und Kroemer, 2004b; Spierings et al., 2005; Ow et al., 2008; Riedl und Salvesen, 2007).

Cytochrom c wurde in zytosolischen Extrakten der B-NHL-Zelllinien nach 12 h Behandlung mit Rituximab oder 4 h mit Staurosporin (25 nM) in Anwesenheit des Caspaseninhibitors zVADfmk, damit die Induktion der Apoptose auf Ebene der Caspasen gestoppt wurde, mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.8).

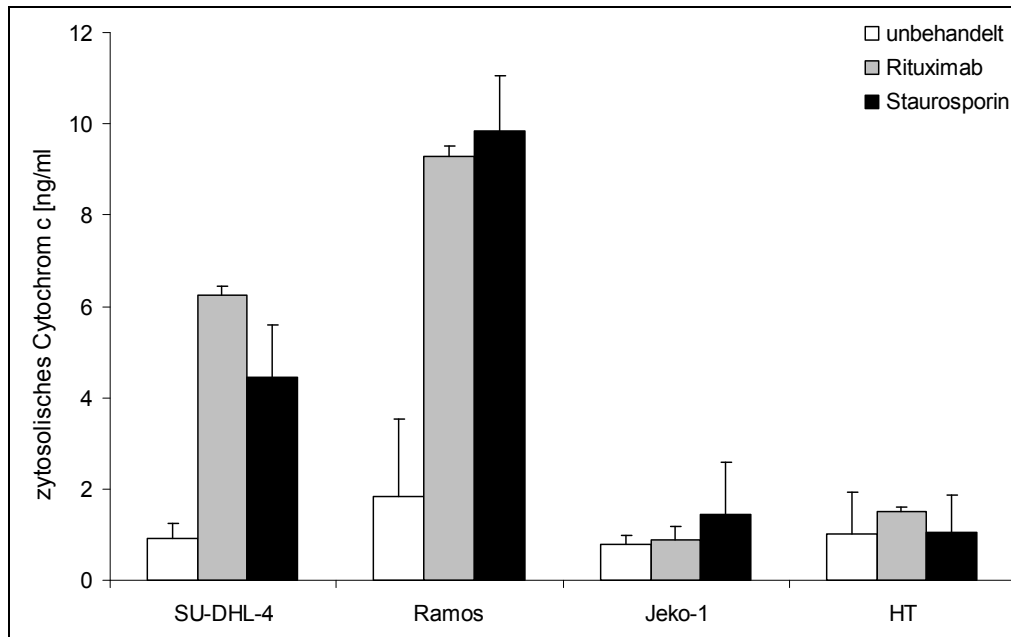


Abbildung 3.8 Rituximab- und Staurosporin-induzierte Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Nach 12 h Behandlung mit quervernetztem Rituximab oder 4 h mit 25 nM Staurosporin wurden in zytosolischen Zellextrakten von Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos sowie den resistenten Jeko-1 und HT zytosolisches Cytochrom c mittels ELISA nachgewiesen. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Der Vergleich von zytosolischem Cytochrom c nach Rituximab- und Staurosporin-Behandlung der beiden Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos mit den resistenten Zelllinien Jeko-1 und HT zeigte nur in den sensitiven Zellen eine Cytochrom c-Freisetzung. Bei den resistenten Zellen ist die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien blockiert.

3.1.2.4 Rituximab-induzierter Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Aufgrund der Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran während der Apoptosekaskade kommt es zum Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) können Änderungen des mitochondrialen Transmembranpotentials nachgewiesen werden.

Um zu bestätigen, dass Rituximab intrinsische, „mitochondriale“ Apoptose induziert und es dabei zu einer Depolarisierung der Mitochondrienmembran kommt, wurden die Rituximab-sensitiven und -resistenten Zelllinien für 24 h mit monomerem und quervernetztem Rituximab behandelt und die Änderung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) verglichen. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch mittels TMRE-Färbung (Abb. 3.9, 3.10).

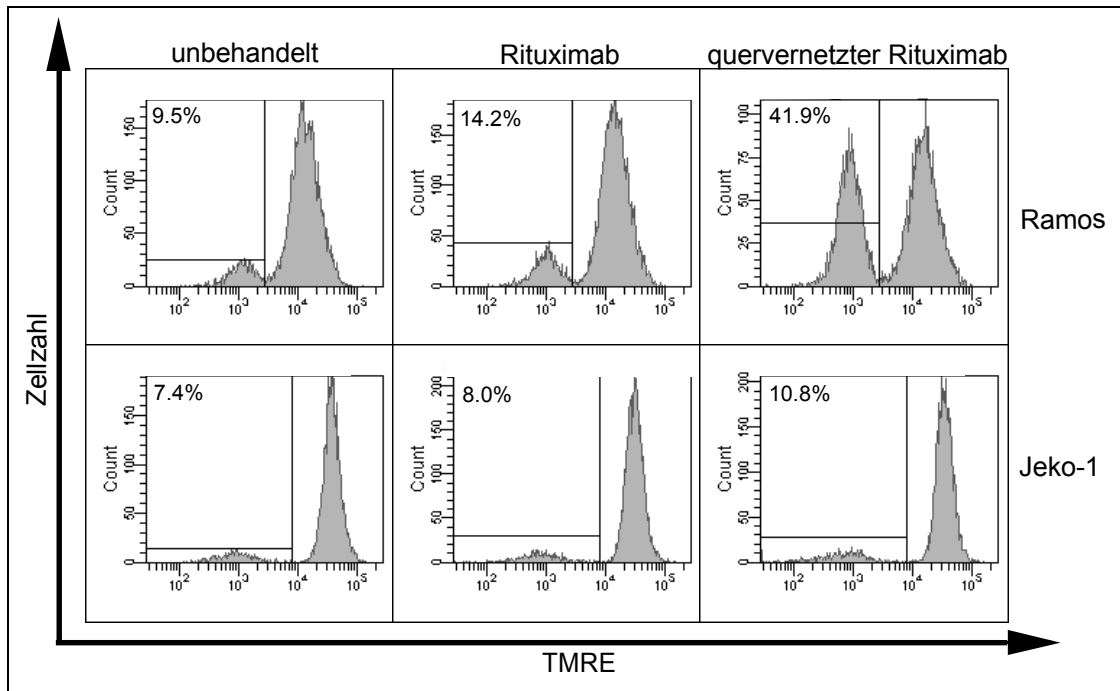


Abbildung 3.9 Durchflusszytometrischer Nachweis des Rituximab-induzierten Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ mittels TMRE-Färbung. Die Rituximab-sensitive B-NHL-Zelllinie Ramos und resistenten Zelllinie Jeko-1 wurden für 24 h mit quervernetztem Rituximab behandelt. Der Nachweis der Induktion intrinsischer Apoptose durch Rituximab über die Depolarisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) erfolgte mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs TMRE. Lebende Zellen sind TMRE-positiv, apoptotische Zellen TMRE-negativ.

Die TMRE-Färbung zeigte bei der unbehandelten B-NHL-Zelllinie Ramos, dass 90,5 % der analysierten Zellen intakte Mitochondrien besitzen. Während der Behandlung mit Rituximab kam es bei den Ramos-Zellen zu einem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials, die als TMRE-negative Fraktion quantifiziert wurde. Diese konnte bei den Rituximab-resistenten Jeko-1-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Außerdem wurde beobachtet, dass die Behandlung mit monomerem Rituximab nur bei 14,2 % der behandelten Ramos Zellen das mitochondriale Transmembranpotential beeinflusst. Dagegen waren es bei der Behandlung mit quervernetztem Rituximab 41,9 % der Zellen. Dies bestätigt die Verstärkung der Apoptoseinduktion durch die Kreuzvernetzung von Rituximab.

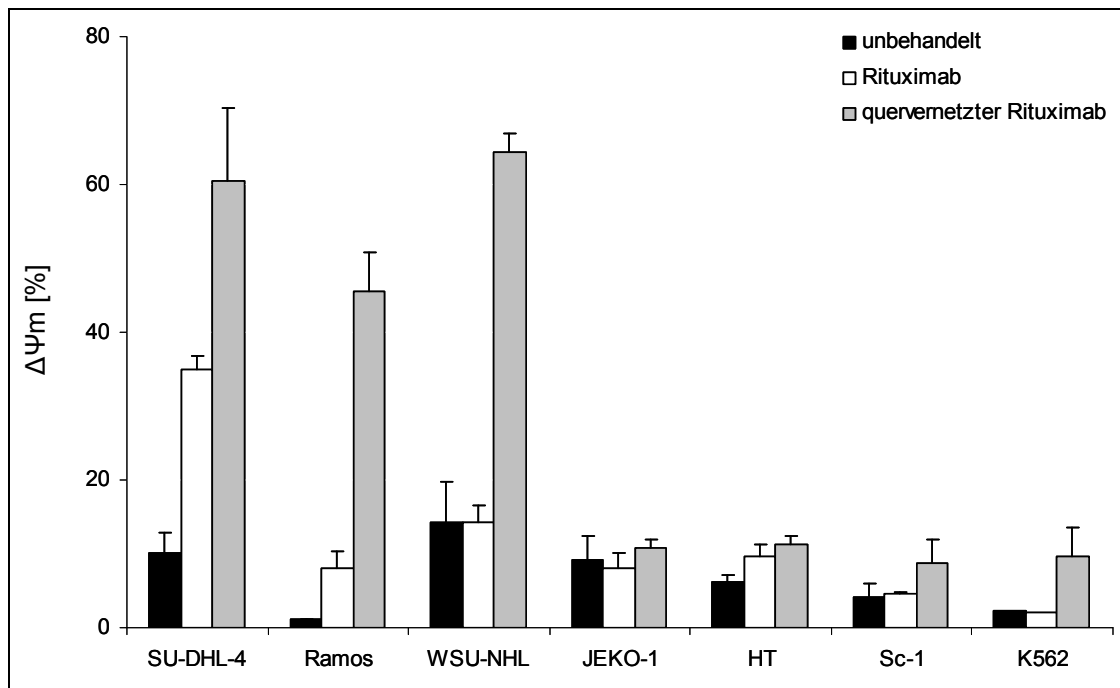


Abbildung 3.10 Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch Rituximab. Um den Rituximab-induzierten Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials in Rituximab-sensitiven und resistenten B-NHL-Zelllinien zu vergleichen, wurden die Zellen 24 h mit monomerem und quervernetztem Rituximab behandelt und durchflusszytometrisch mittels TMRE-Färbung ausgewertet. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Auch die Analyse weiterer Rituximab-sensitiver und resistenter B-NHL-Zelllinien zeigte, dass Rituximab in den sensitiven B-NHL-Zellen SU-DHL-4, Ramos und WSU-NHL Apoptose über die Depolarisierung der äußeren mitochondrialen Membran ($\Delta\Psi_m$) induziert, was zur bereits analysierten Freilassung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma und zur Caspasenaktivierung führt.

Die Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 zeigten dagegen kein Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials durch Rituximab. Das bedeutet, dass die Inhibition der Apoptose bei den resistenten B-NHL eventuell auf der Ebene der pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie stattfindet, durch die die Porenbildung in der Mitochondrienmembran reguliert wird.

3.1.2.5 Proteinexpression der Bcl-2-Proteinfamilie in Rituximab-sensitiven und -resistenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Die Integrität der Mitochondrienmembran ist durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Die beiden pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax bilden durch Homo- und Heterodimerisierung Poren in der äußeren Mitochondrienmembran. Beide werden direkt über die pro-apoptotischen BH3 (*Bcl-2 homology domain 3*)-only Proteine Bim und Bik (Aktivatoren) aktiviert und durch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 inhibiert. Weitere BH3-only Proteine, wie z.B. Bik und Bad (Sensitivierer), wirken pro-apoptotisch, indem sie die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie inhibieren und damit indirekt Apoptose über die Freigabe von Bak und Bax einleiten (Youle und Strasser, 2008; Green und Kroemer, 2004a; Alfredsson et al., 2005; Cory und Adams, 2002; Strasser, 2005; Zhuang und Brady, 2006).

Die Proteinexpression der Bcl-2-Familie wurde in unbehandelten Gesamtproteinextrakten von Rituximab-sensitiven und -resistenten B-NHL-Zellen verglichen (Abb. 3.11).

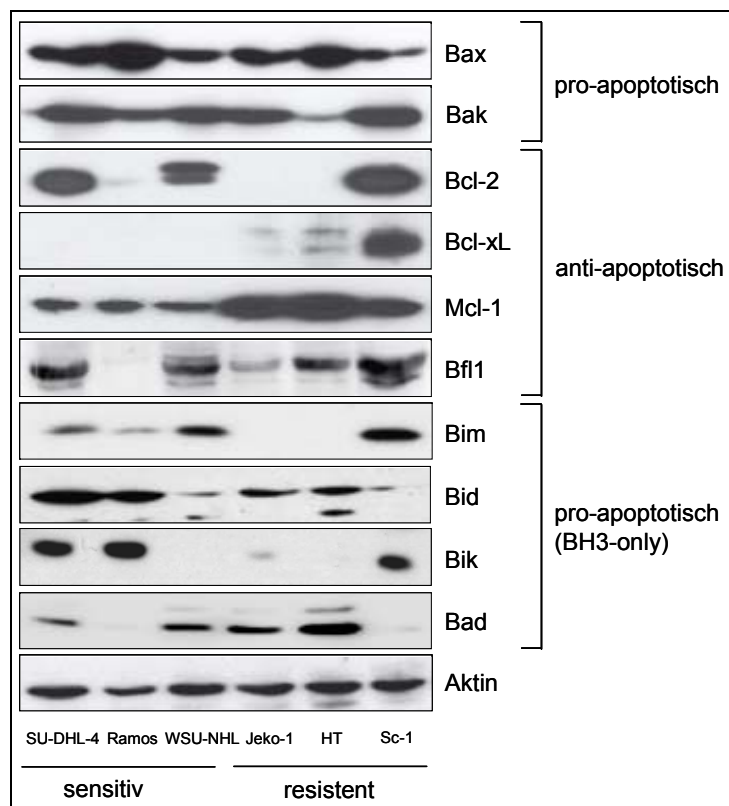


Abbildung 3.11 Vergleich der Proteinexpression der pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in Rituximab-sensitiven und -resistenten B-NHL-Zellen mittels Western Blot. In unbehandelten Proteinextrakten der sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL4, Ramos und WSU-NHL sowie der resistenten Zellen Jeko-1, HT und Sc-1 wurde die Proteinexpression der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax, der pro-apoptotischen BH3-only Proteine Bim, Bid, Bik und Bad sowie der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 und Bfl-1 verglichen.

Bei dem Vergleich der Proteinexpression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie in Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien mit –resistenten konnte nachgewiesen werden, dass die resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 anti-apoptotisches Bcl-x_L oder Mcl-1 höher exprimieren. Die erhöhte Expression von Bcl-2 in den B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, WSU-NHL und Sc-1 basiert auf der chromosomalen Translokation t(14;18) und hat keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Rituximab. Bei der Expression der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax konnte kein Unterschied zwischen sensitiven und resistenten B-NHL-Zellen beobachtet werden. Dagegen werden die pro-apoptotischen Proteine Bid und Bik in den sensitiven B-NHL-Zellen SU-DHL-4 und Ramos verstärkt exprimiert. Allerdings ist die Gruppe der pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine sehr unterschiedlich in den verschiedenen B-NHL-Zelllinien exprimiert.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Resistenz gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose auf der erhöhten Expression der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L beruhen könnte.

3.1.2.6 Transkriptionelle und translationale Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie durch Rituximab

Die Regulation der pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie erfolgt transkriptionell, translational oder posttranslational. Außerdem interagieren die verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie über ihre BH3-Domäne in einem komplexen Netzwerk aktivierend oder inhibitorisch miteinander. Offenbar werden die BH3-*only* Proteine, die nur die BH3 (*Bcl-2 homolog*)-Domäne besitzen, spezifisch über definierte extra- oder intrazellulären Todessignalen aktiviert (Cory und Adams, 2002; Cory et al., 2003; Strasser, 2005; Puthalakath und Strasser, 2002).

Bisher ist unbekannt, welche Rolle die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie bei der Rituximab-induzierten Apoptose spielen. Auch die Regulation der BH3-*only* Proteine durch Rituximab ist bisher nicht untersucht worden. Deshalb wurde die transkriptionelle und translationale Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie, mit besonderem Fokus auf die BH3-*only* Proteine, analysiert. Nach Behandlung Rituximab-sensitiver und –resistenter B-NHL-Zelllinien mit Rituximab wurde mittels quantitativer *Real time*-PCR und Western Blot die Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie durch Rituximab untersucht (Abb. 3.12, 3.13).

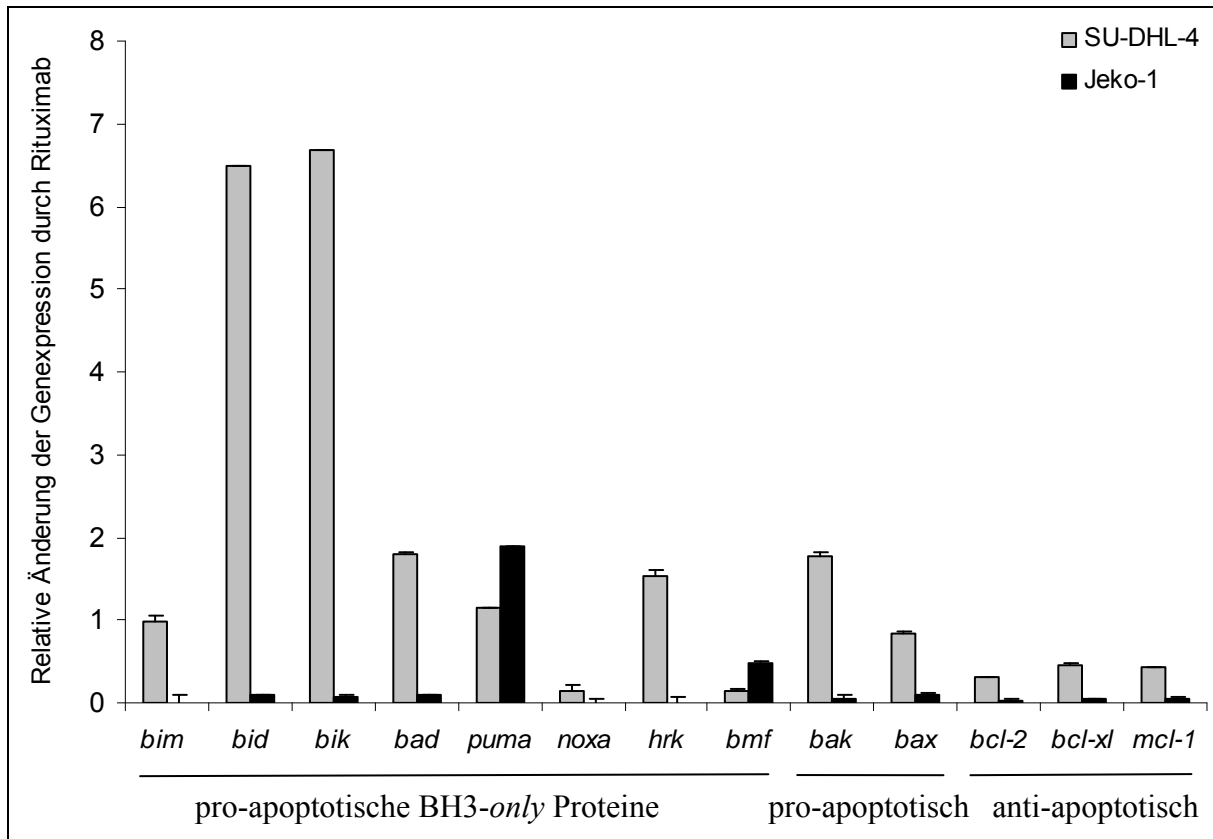


Abbildung 3.12 Vergleich der transkriptionellen Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie durch Rituximab in der sensitiven Zelllinie SU-DHL-4 und der resistenten Zelllinie Jeko-1 mittels quantitativer *Real-time* PCR. Die B-NHL-Zellen wurden für 4 h mit monomerem Rituximab behandelt, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *Real-time*-PCR die relative Änderung der Genexpression der pro- und anti-apoptischen Proteine der Bcl-2-Familie analysiert.

Die Analysen zur relativen Änderung der Genexpression der pro- und anti-apoptischen Proteine der Bcl-2-Familie durch Rituximab zeigte eine verstärkte Expression der Gene für pro-apoptisches *Bid* und *Bik* in der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinie SU-DHL-4. Im Vergleich dazu waren in der resistenten Zelllinie Jeko-1 alle untersuchten Gene der Bcl-2-Proteinfamilie, bis auf das Gen für das pro-apoptische BH3-only Protein *Puma*, durch Rituximab herunterreguliert.

Aufgrund der unterschiedlichen Regulation oder Stabilität von mRNA und Proteinen, kann von der induzierten mRNA eines Gens jedoch nicht auf eine höhere Proteinexpression geschlossen werden. Daher wurde die Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie durch Rituximab auch auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden die sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos sowie die resistenten Zelllinien Jeko-1 und HT 12 h mit Rituximab behandelt, Gesamtproteinextrakte gewonnen und mittels Western Blot die Änderung der Proteinexpression der Bcl-2-Familie analysiert (Abb. 3.13).

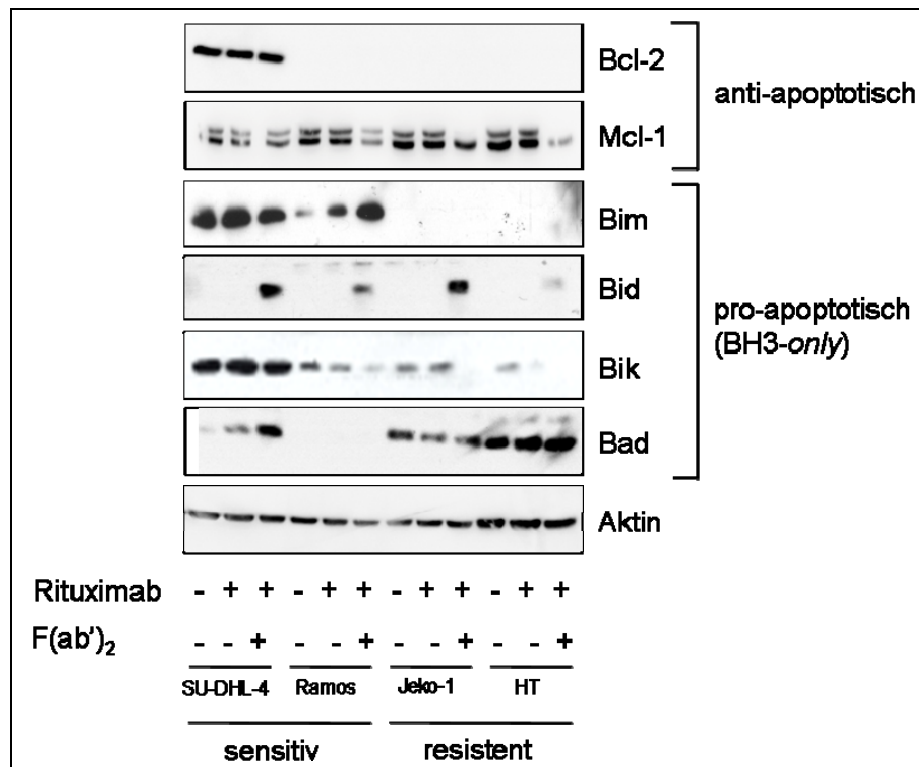


Abbildung 3.13 Vergleich der Regulation der Proteinexpression der Bcl-2-Familie durch Rituximab. Nach 12 h Behandlung mit monomeren oder quervernetztem (F(ab')₂) Rituximab wurden Gesamtproteinextrakte gewonnen und die Änderung der Proteinexpression der Bcl-2-Familie mittels Western Blot analysiert.

Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wird aufgrund der chromosomalen Translokation t(14;18) in den Rituximab-sensitiven SU-DHL-4 überexprimiert. Allerdings hat die erhöhte Expression von Bcl-2 keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Rituximab-Behandlung und wird durch Rituximab auch nicht reguliert. Im Vergleich dazu wird das anti-apoptotische Protein Mcl-1 in den resistenten Zelllinien Jeko-1 und HT stärker exprimiert, als in den sensitiven Zelllinien, und wird durch Rituximab herunter reguliert. Die pro-apoptotische Isoform des BH3-only Proteins Bim_{EL} (*extra long isoform*) wird nur in den sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos exprimiert und durch Rituximab in Ramos-Zellen weiter induziert. Auch das pro-apoptotische BH3-only Protein Bid wird durch die Behandlung der B-NHL-Zellen mit quervernetztem Rituximab induziert, was mit den qRT-PCR-Messungen korreliert. Bik ist in den Rituximab-sensitiven Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos höher exprimiert, wird allerdings durch die Rituximab-Behandlung herunterreguliert. Das Protein Bad wird dagegen in den resistenten B-NHL-Zellen höher exprimiert und durch Rituximab in den sensitiven SU-DHL-4-Zellen induziert. Über Bad ist bekannt, dass es durch die Seronin/Threonin-Proteinkinase Akt phosphoryliert, von dem Protein 14-3-3 gebunden

wird und dadurch das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L freigelassen wird (Datta et al., 1997; Datta et al., 1999).

Zusammengefasst bestätigen diese Untersuchungen die These, dass Rituximab über die Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie Apoptose induziert.

3.1.2.7 Induktion von Rituximab-Resistenz in sensitiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durch Bcl-x_L-Expression

Um die Bedeutung des intrinsischen Signalwegs für die Rituximab-induzierte Apoptose auch genetisch zu bestätigen, wurde das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L in den Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ramos und WSU-NHL mittels retroviraler Transduktion stabil exprimiert. Bcl-x_L ist ein starker Inhibitor der intrinsischen Apoptose und schützt Zellen besser vor der Induktion von Apoptose als Bcl-2 (Shimizu et al., 1995; Gottschalk et al., 1994). Die anti-apoptotischen Wirkungen von Bcl-x_L basieren vor allem auf der direkten Inhibition von Bak und Bax sowie des pro-apoptotischen BH3-*only* Proteins tBid (*truncated Bid*) (Cheng et al., 1996; Billen et al., 2008). Bcl-x_L ist in verschiedenen Tumortypen verstärkt exprimiert und ist assoziiert mit Therapieresistenz (Espana et al., 2004; Olopade et al., 1997; Simonian et al., 1997; Bairey et al., 1999). Auch für die Therapie von B-NHL mit Rituximab wurde Bcl-x_L als möglicher Resistenzfaktor beschrieben (Bonavida, 2007).

Die Bcl-x_L-exprimierenden B-NHL-Zelllinien wurden 48 h mit quervernetztem Rituximab behandelt und die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch anhand der Sub-G1-Fraktion bestimmt (Abb. 3.14B). Als Kontrollen dienten Zellen, die entweder den Leervektor, eine dominant-negative Mutante von FADD (*Fas-associated protein with death domain*, DN-FADD) oder eine dominant-negative Mutante der Caspase-9 (DN-Caspase-9) stabil exprimierten (ABB. 3.14A).

FADD ist ein intrazelluläres Adaptermolekül das mithilfe der C-terminalen Todesdomäne (*death domain*) an den Todesrezeptors Fas (CD95) bindet. Die N-terminale Effektordomäne von FADD rekrutiert die Initiatorcaspase-8 in den Proteinkomplex DISC (*death inducing signaling complex*), der das extrazelluläre Apoptosesignal intrazellulär weiterleitet (Eberstadt et al., 1998; Peter und Krammer, 2003; Barnhart et al., 2003). DN-FADD enthält die C-terminale Todesdomäne und kann intrazellulär an die Todesrezeptoren binden. Allerdings fehlt die N-terminale Effektordomäne wodurch das Apoptosesignal nicht weiter gegeben

werden kann. Der Todesrezeptor-vermittelte, extrinsische Apoptosesignalweg ist somit inhibiert.

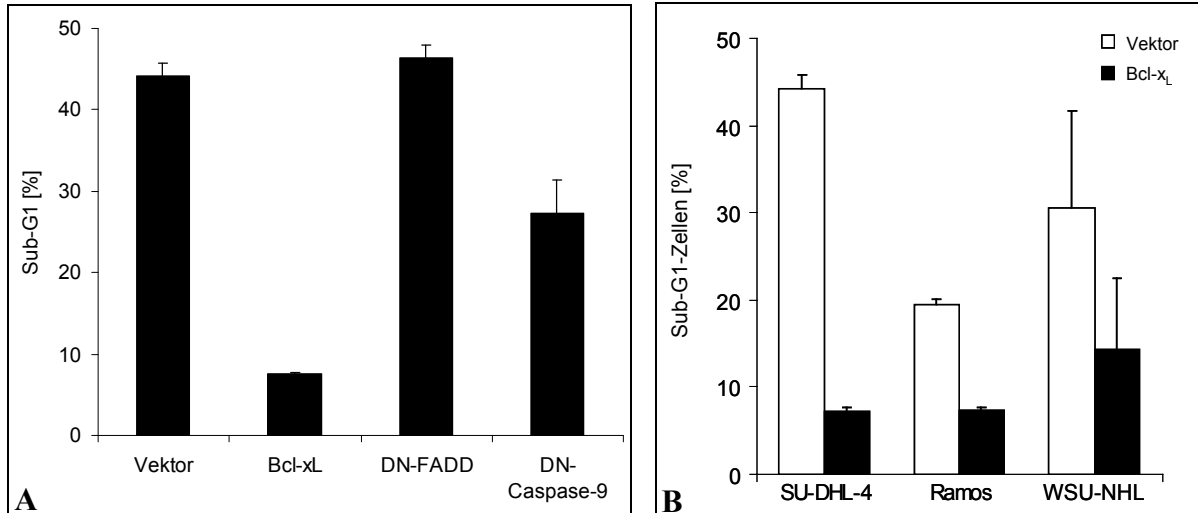


Abbildung 3.14 Induktion von Resistenz gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose in sensitiven B-NHL-Zelllinien mittels stabiler Expression von Apoptoseinhibitoren. (A) In die Rituximab-sensitive B-NHL-Zelllinie SU-DHL-4 wurde mittels retroviraler Transduktion das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L, um die intrinsische Apoptose zu inhibieren, dominant-negatives FADD (DN-FADD), um den extrinsischen Apoptosesignalweg zu inhibieren und eine dominant-negative Mutante der Caspase-9 (DN-Caspase-9) stabil exprimiert. Die Apoptoseinduktion durch quervernetzten Rituximab wurde in den genetisch veränderten Zellen nach 48 h Behandlung durchflusszytometrisch anhand der apoptotischen DNA-Fragmentierung bestimmt. (B) Die Induktion von Rituximab-Resistenz durch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L und der damit verbundenen Blockade des intrinsischen Apoptosesignalweges wurde in den sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL4, Ramos und WSU-NHL bestätigt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L in der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinie SU-DHL-4 inhibierte die Rituximab-induzierte Apoptose um ca. 85 % ($p = 0,0013$), während die DN-Caspase-9 eine Inhibition um ca. 40 % ($p = 0,1395$) vermittelte. Die Hemmung des extrinsischen Apoptosesignalweges durch DN-FADD hatte keinen Einfluss auf die Rituximab-induzierte Apoptose ($p = 0,4292$). Dies zeigte, dass Rituximab Apoptose über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg induziert, der durch das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L inhibiert werden kann. Dieser inhibitorische Effekt von Bcl-x_L konnte in weiteren, sensitiven B-NHL-Zellen (Ramos, WSU-NHL) bestätigt werden. Die verstärkte Expression der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie wurde somit als möglicher Resistenzmechanismus gegenüber Rituximab-Behandlung von B-NHL *in vitro* identifiziert.

3.1.3 Charakterisierung der Rituximab-induzierten intrazellulären Signaltransduktion

Bisher ist unbekannt, wie die intrazelluläre Signaltransduktion nach extrazellulärer Bindung von Rituximab an CD20 weiter zur Bcl-2-Proteinfamilie gelangt. Zentrale, intrazelluläre Signaltransduktionswege, die auch an der Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie beteiligt sein können, sind der MAPK und der PI3K/Akt-Signalweg. Um den Einfluss von Rituximab auf beide Signalwege genauer zu charakterisieren, wurden Rituximab-sensitive SU-DHL-4- und Ramos-Zellen sowie die resistenten Jeko-1- und HT-Zellen 4 h mit Rituximab behandelt. Die Gesamtproteinextrakte wurden hinsichtlich der Proteinexpression sowie der Proteinphosphorylierung verschiedener Proteinkinasen analysiert (Abb. 3.15). Anhand des Phosphorylierungsgrades kann auf die Proteinaktivität der Kinasen geschlossen werden. Die Modulation der MAPK p38, JNK und ERK1/2 sowie von Akt, PDK1 (*3-phosphoinositide dependent kinase 1*) und GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase-3 β) durch Rituximab wurde mittels Western Blot analysiert.

Bei dem PI3K-Signalweg wird das intrazelluläre Signal von der PI3K über die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) direkt an PDK1 und Akt weitergeleitet. Die Aktivität von Akt wird durch die Serin/Threoninkinasen PDK1 und mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) sowie durch die Proteinphosphatase PP2A und PHLPP (*PH domain leucin-rich repeat phosphatase*) streng reguliert. PDK1 phosphoryliert Akt an der Aminosäure Threonin-308 innerhalb der regulatorischen Domäne und durch mTORC2 an Serin-473 innerhalb der Kinasedomäne.

Akt ist eine zentrale Proteinkinase innerhalb der intrazellulären Signaltransduktion und reguliert die Aktivität verschiedener Proteine, die z.B. am Zellwachstum (p21^{Cip}, p27^{Kip}, Cyclin D1, I κ B-Kinase, GSK-3 β), der Proteinsynthese (TSC2, mTOR, S6K), Glucose-Metabolismus und der Apoptose (Bad, Bim, MDM2, FoxO1, Caspase-9) beteiligt sind. Als Akt-Zielmolekül wurde beispielhaft GSK-3 β analysiert. GSK-3 β wird durch Phosphorylierung von Akt an Serin-9 inhibiert, wodurch unter anderem die Phosphorylierung und Degradation von Cyclin D1 oder Mcl-1 gestoppt wird (Abb. 3.15).

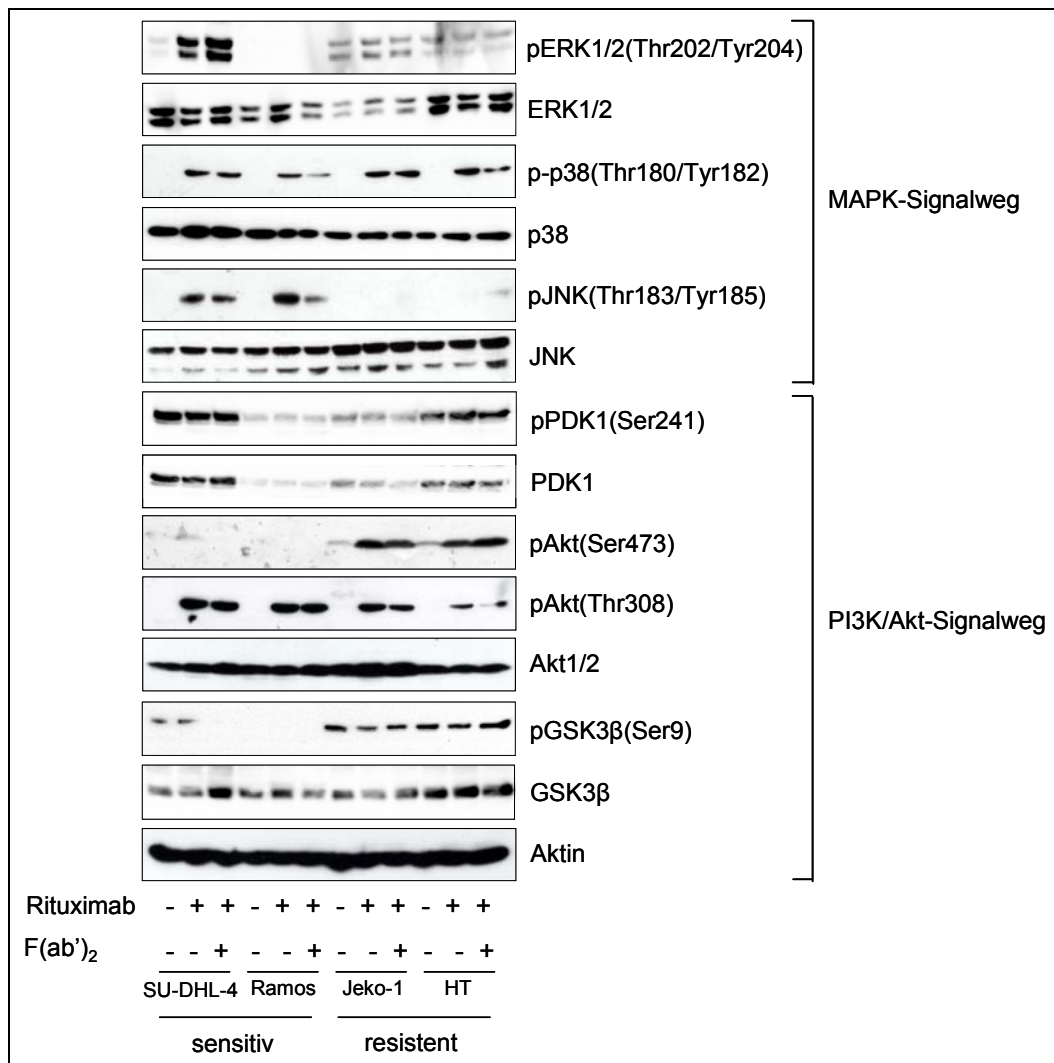


Abbildung 3.15 Modulation des MAPK- und PI3K/Akt-Signalweges 4 durch Rituximab in B-NHL-Zelllinien. In den Gesamtzellproteinextrakte der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinie SU-DHL4 und Ramos sowie der resistenten Jeko-1 und HT wurde mittels Western Blot die Änderung des Phosphorylierungsgrades der MAPK ERK1/2, p38 und JNK sowie der Proteinkinasen PDK1, Akt und GSK-3 β des PI3K/Akt-Signalweges durch Rituximab. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch aus mehreren unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der Rituximab-induzierten Modulation der intrazellulären Signaltransduktion zeigte eine Aktivierung der stressinduzierten, pro-apoptotischen MAPK JNK in den Rituximab-sensitiven SU-DHL-4- und Ramos-Zellen. Die Phosphorylierung von p38 durch Rituximab wurde in allen untersuchten B-NHL-Zelllinien beobachtet.

Eine Aktivierung von ERK1/2 durch Rituximab wurde vor allem in der sensitiven B-NHL-Zelllinie SU-DHL-4 beobachtet. Des Weiteren wurde in den Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1 und HT eine konstitutive Aktivierung von Akt anhand der Phosphorylierung an Serin-473 beobachtet, die durch Rituximab weiter verstärkt wurde. Die Phosphorylierung innerhalb der regulatorischen Domäne von Akt an Threonin-308 wird durch Rituximab in allen untersuchten B-NHL-Zelllinien vergleichbar induziert. Die konstitutive Aktivierung von

Akt wurde durch die konstitutive, inhibierende Phosphorylierung von GSK-3 β in den resistenten B-NHL-Zellen bestätigt. Wahrscheinlich basiert die konstitutive Aktivierung von Akt in diesen Zellen auf einem Verlust des Tumorsuppressors PTEN. Die konstitutive Aktivierung von Akt könnte somit ein weiterer Mechanismus, der Resistenz gegenüber Rituximab sein.

3.1.4 Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien *in vitro*

3.1.4.1 Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durch das BH3-Mimetikum ABT-737

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass die Rituximab-Resistenz auf den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie und auf einer konstitutiven Aktivierung der Proteinkinase Akt beruhen kann. Um dies zu bestätigen, sollten resistente B-NHL-Zellen bei einer Inhibition der genannten Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab sensitiviert werden.

Zur Inhibition der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 wurde das BH3-Mimetikum ABT-737 (Abbott) verwendet. Die Struktur dieses molekularen Inhibitors basiert auf der BH3-Proteindomäne des pro-apoptotischen Proteins Bad, durch das die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w gebunden und inhibiert werden (Oltersdorf et al., 2005). Bisher wurde ABT-737 nur in präklinischen Studien untersucht und gezeigt, dass es in Kombination mit anderen Tumortheraeutika gegenüber Apoptoseinduktion sensitivieren kann (Konopleva et al., 2006; Kohl et al., 2007). Allerdings wurde auch beobachtet, dass eine verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 Resistenz gegenüber ABT-737 vermitteln kann, da nur Bcl-2 und Bcl-x_L inhibiert werden (van Delft et al., 2006; Chen et al., 2007; Deng et al., 2007; Wesarg et al., 2007).

Die Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 wurden für 48 h mit Rituximab in Kombination mit ABT-737 behandelt. Titrationsvorversuche für ABT-737 hatten gezeigt, dass die Zelllinien Jeko-1 und HT gegenüber der Behandlung mit ABT-737 resistenter als die Zelllinie Sc-1 sind. Diese Zelllinien wurden daher mit 100 nM ABT-737 behandelt. Die Zelllinie Sc-1 dagegen reagierte sensitiver auf ABT-737 und wurde mit 20 nM ABT-737 behandelt. Nach 48 h wurde die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch anhand

der Sub-G1-Fraktion bestimmt und die Behandlung von Rituximab alleine mit der Kombination mit ABT-737 verglichen (Abb. 3.16). Statistisch wurden diese Unterschiede mit dem t-Test ausgewertet, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ angenommen wurde.

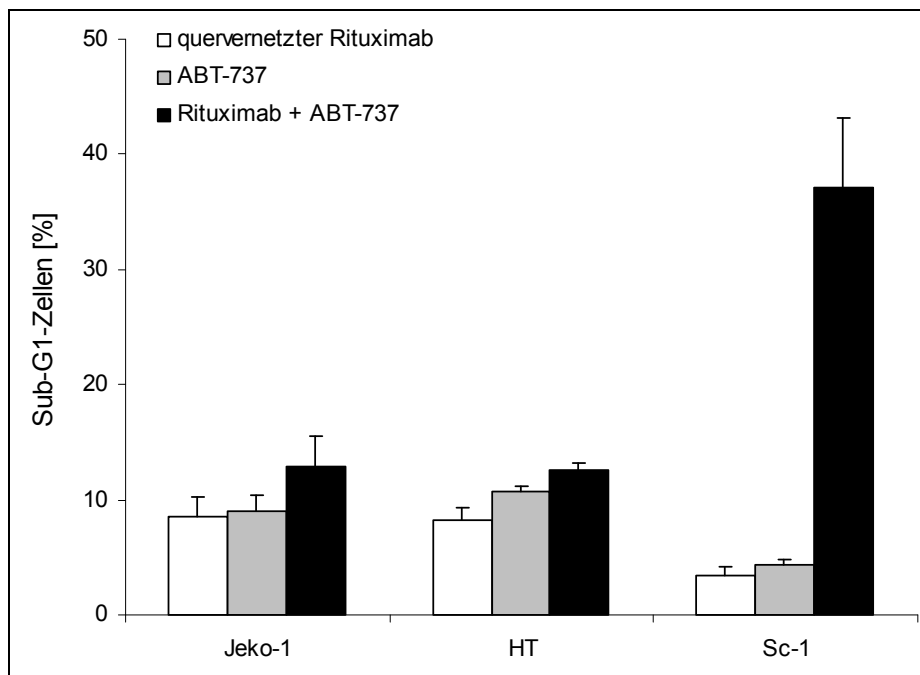


Abbildung 3.16 Sensitivierung der Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose mit dem BH3-Mimetikum ABT-737. Die B-NHL-Zelllinien wurden 48 h mit quervernetztem Rituximab und ABT-737 alleine sowie mit der Kombination aus Rituximab und ABT-737 behandelt. Die Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch anhand der Sub-G1-Fraktion quantitativ bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Die Kombination von Rituximab mit dem BH3-Mimetikum ABT-737 sensitivierte nur die Rituximab-resistente B-NHL-Zelllinie Sc-1 gegenüber der Behandlung mit Rituximab ($p = 0,0125$). Die beiden anderen Zelllinien Jeko-1 und HT konnten wahrscheinlich aufgrund ihrer intrinsischen Resistenz gegenüber ABT-737 nicht gegenüber Rituximab sensitiviert werden. Voraussichtlich beruht diese beobachtete ABT-737-Resistenz auf einer verstärkten Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1, dass durch ABT-737 nicht inhibiert wird.

3.1.4.2 Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durch pharmakologische Inhibition des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges

Bei den Rituximab-resistenten B-NHL-Zellen Jeko-1 und HT konnte in vorangegangenen Analysen nachgewiesen werden, dass sie aufgrund eines PTEN-Verlustes eine konstitutive Aktivierung der Proteinkinase Akt aufzeigen. Über den PI3K/Akt-Signalweg ist bekannt, dass er bei konstitutiver Aktivierung in B-Zell-Lymphomen Therapieresistenz induzieren kann (Rudelius et al., 2006; Uddin et al., 2006; Renne et al., 2007). Allerdings wurde der Einfluss der konstitutiven Aktivierung von Akt auf die Resistenz gegenüber Rituximab bislang nicht untersucht.

Um nachzuweisen, dass die Resistenz gegenüber Rituximab auf der konstitutiven Aktivierung von Akt beruht, wurden die Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 für 48 h mit Rituximab in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (10 μ M) behandelt. Die Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.17A). Des Weiteren wurden Proteinextrakte 1 h nach Behandlung mit LY294002 gewonnen, um den Mechanismus der Sensitivierung anhand des PI3K/Akt-Signalweges und der Bcl-2-Proteinfamilie aufklären zu können (Abb. 3.17B).

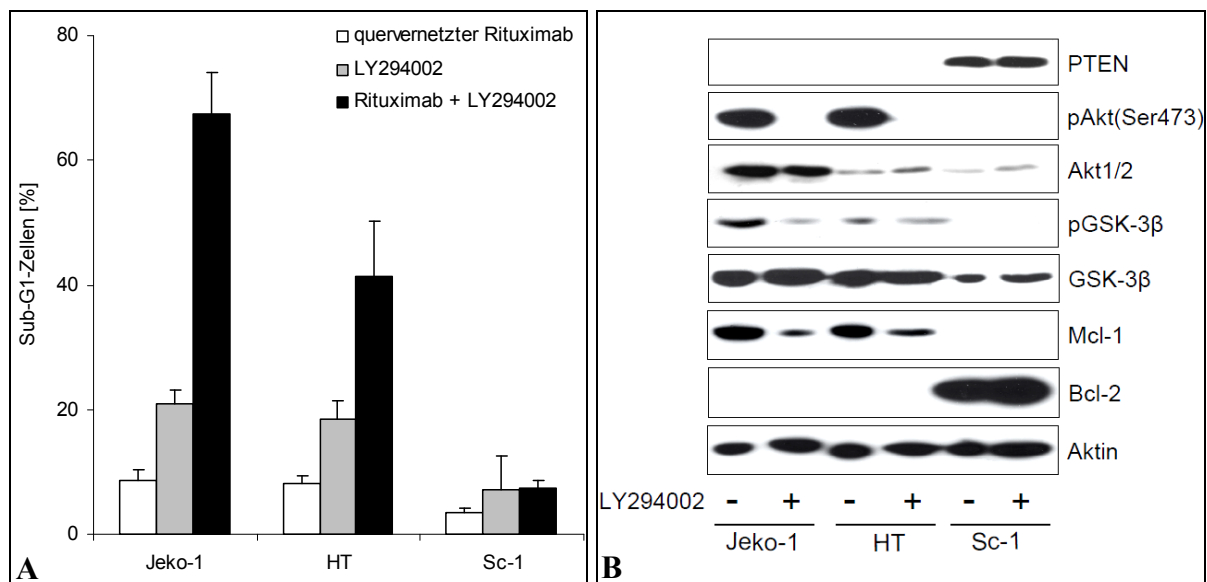


Abbildung 3.17 Sensitivierung der resistenten B-NHL-Zelllinien gegenüber Rituximab durch Inhibition des konstitutiv aktiven PI3K/Akt-Signalweges. (A) Die B-NHL-Zellen wurden 48 h mit quervernetztem Rituximab, dem PI3K-Inhibitor LY294002 (10 μ M) und der Kombination aus Rituximab mit LY294002 behandelt. Die Apoptose wurde durchflusszytometrisch anhand der Sub-G1-Fraktion bestimmt (n = 3). (B) Western Blot-Analyse von Proteinextrakten der Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1, HT und Sc-1 nach 1 h Behandlung mit LY294002.

Durch den PI3K-Inhibitor LY294002 konnten die resistenten B-NHL-Zelllinien Jeko-1 ($p = 0,0001$) und HT ($p = 0,0421$) gegenüber der Therapie mit Rituximab *in vitro* sensitiviert werden. Die Western Blot-Auswertung bestätigte den Einfluss des PI3K-Inhibitors auf die Aktivität der Proteinkinase Akt und dessen Zielmolekül GSK-3 β sowie auf die Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1. Damit konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der PI3K die konstitutive Aktivierung von Akt aufgehoben werden konnte und dadurch das anti-apoptotische Protein Mcl-1 herunterreguliert wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die sensitivierenden Wirkungen von LY294002 auf der Inhibition von Akt und Mcl-1 beruhen.

3.2 Charakterisierung der Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab *in vivo*

3.2.1 Etablierung eines humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Xenotransplantationsmodells in NOD/SCID-Mäusen

Die Bedeutung der *in vitro* identifizierten Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab, basierend auf einer erhöhten Expression von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie und der konstitutiven Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, sollte weiter *in vivo* untersucht werden. Dafür wurde ein humanes B-NHL-Xenotransplantationsmodell in sublethal bestrahlten, immuninkompetenten NOD/SCID (*non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency*)-Mäusen etabliert. Diese Mäuse besitzen keine funktionellen T- und B-Lymphozyten sowie reduzierte NK-Zell- und Komplementaktivität. Dadurch war es mit diesem Modell möglich, die direkten Wirkungen von Rituximab auf die B-NHL-Zelllinien *in vivo* zu untersuchen und indirekte, immunologische Wirkmechanismen, wie ADCC und CDC, weitgehend auszuschließen.

Den NOD/SCID-Mäusen wurden 10^7 Rituximab-sensitive Ramos- oder –resistente HT-Zellen intravenös appliziert und die Symptome der Lymphomkrankheit analysiert. Mithilfe immunhistochemischer und durchflusszytometrischer Analysen wurde die Ansiedlung humaner B-NHL-Zellen in verschiedenen Organen der NOD/SCID-Mäuse nachgewiesen. Dabei wurde die Änderung der Organmorphologie mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht und die humanen B-NHL mit einem anti-human CD20 Antikörper immunhistochemisch markiert. Des Weiteren wurde die proliferative Aktivität der humanen

B-NHL in den Mäusen mit dem Mitosemarker Ki67 immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 3.18).

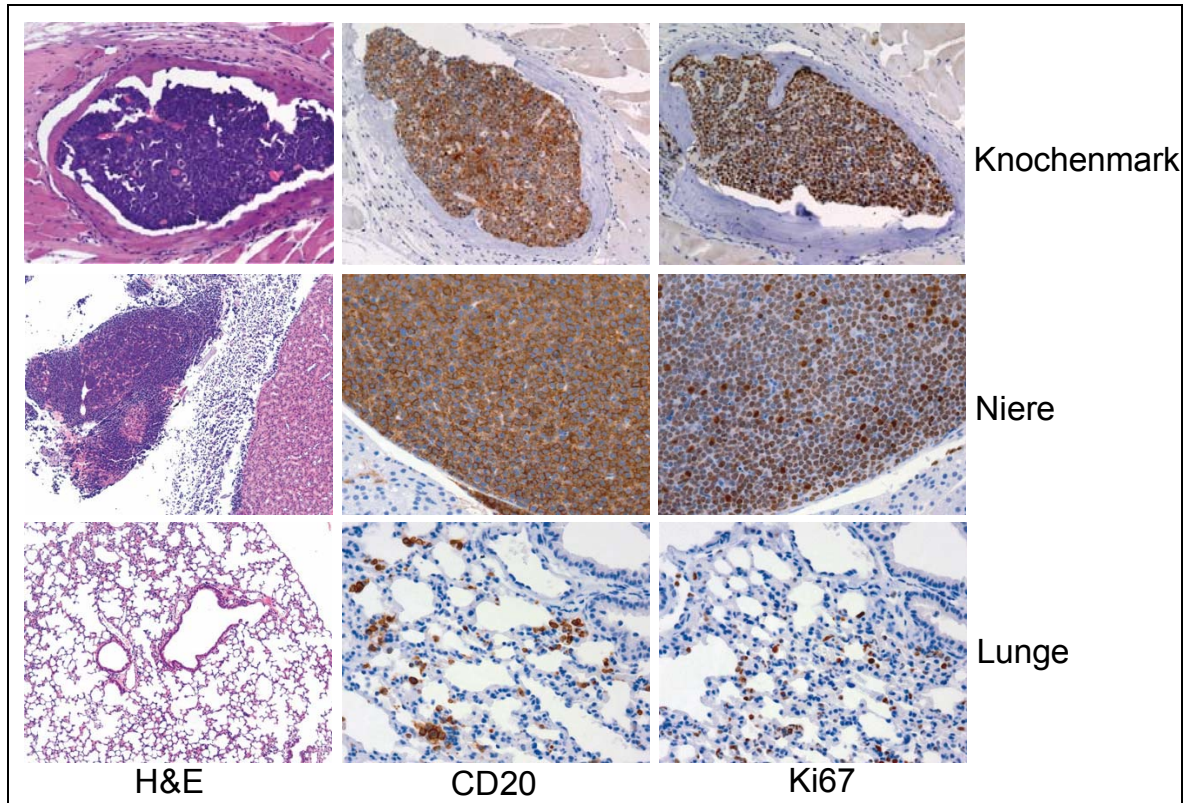


Abbildung 3.18 Immunhistochemische Analyse des Knochenmarks, der Niere und der Lunge von NOD/SCID-Mäusen, die mit der humanen B-NHL-Zelllinie Ramos xenotransplantiert wurden. Gewebeschnitte von Paraffin-fixierten Organen wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung morphologisch auf die Infiltration humaner B-NHL-Zellen untersucht. Der spezifische Nachweis der humanen B-NHL erfolgte durch immunhistochemische Färbung mit einem anti-human CD20-Antikörper. Die Ki67-Färbung diente als Nachweis, dass die infiltrierten humanen B-NHL proliferativ aktiv sind.

Die humanen B-NHL-Zellen wurden vor allem in dem Knochenmark, der Niere und der Lunge sowie in den Lymphknoten, der Milz, der Leber und der Niere gefunden. Teilweise zeigten die Mäuse Lähmungserscheinungen der Hinterbeine aufgrund einer Lymphominfiltration in das Rückenmark oder weitere Symptome, wie z.B. starker Gewichtsverlust, die auf eine fortschreitende Lymphomerkrankung zurückzuführen waren.

3.2.2 Rituximab-Behandlung der humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome in NOD/SCID-Mäusen

Das humane B-NHL-Xenotransplantationsmodell wurde weiter zur Untersuchung der direkten Rituximab-Wirkung *in vivo* verwendet. In den bisher verwendeten *in vivo*-Modellen wurden nur die indirekten, immunologischen Wirkungen über NK-Zellen (ADCC) und Komplement (CDC) untersucht und die direkten Wirkungen vernachlässigt (Golay et al., 2006; Cragg und Glennie, 2004; Di Gaetano et al., 2003; Clynes et al., 2000).

Um die direkten Wirkungen von Rituximab *in vivo* genauer zu charakterisieren, wurden 10^7 Rituximab-sensitive Ramos-Zellen intravenös in die NOD/SCID-Mäuse injiziert und von Tag 5 bis Tag 10 nach Xenotransplantation täglich und weiter bis zum Versuchsende zweimal wöchentlich intraperitoneal mit Rituximab (20 mg / kg) behandelt. Diese Dosis entspricht in etwa der Dosis von 375 mg / m², die klinisch bei B-NHL-Patienten verwendet wird. Die Überlebenskurven der unbehandelten Mäuse wurden mit den Rituximab-behandelten Mäusen verglichen und mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt (je 10 Tieren pro Gruppe). Als Versuchsendpunkt wurden Symptome von fortgeschrittener Lymphominfiltration, die Hinterbeinlähmung oder der Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Körpergewichts verwendet. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe wurden statistisch mit dem Logrank-Test (Mantel-Cox-Schätzer) ausgewertet (Abb. 3.19).

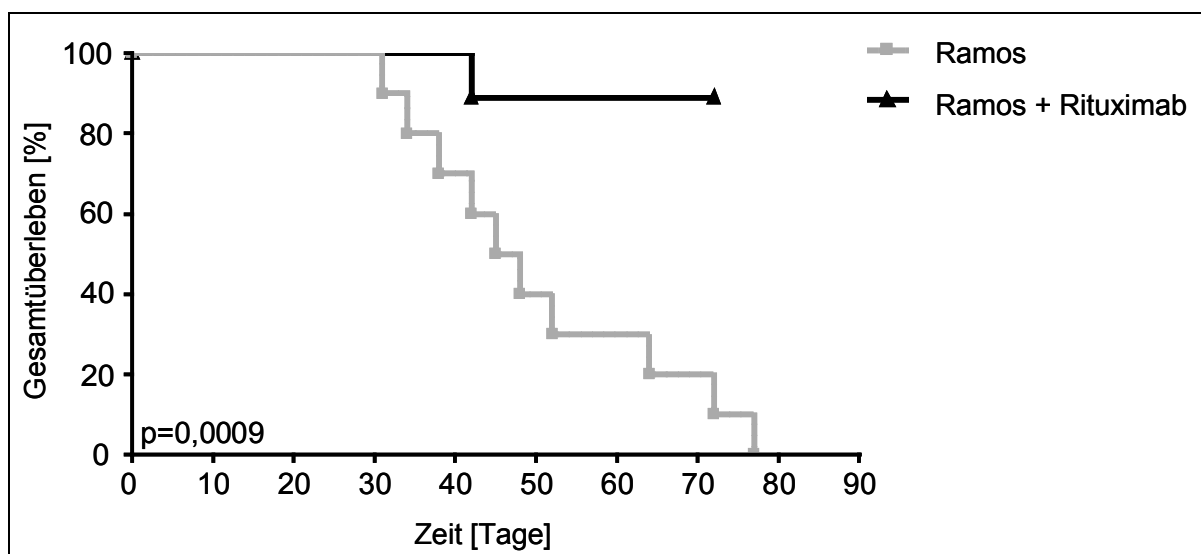


Abbildung 3.19 Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Xenotransplantation von Rituximab-sensitiven Ramos -Zellen in NOD/SCID-Mäusen mit und ohne Rituximab-Behandlung. 10^7 Zellen der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinie Ramos wurden intravenös in NOD/SCID-Mäuse injiziert. Nach 5 Tagen wurden die Mäuse mit 20 mg / kg Rituximab intraperitoneal behandelt (n = 10).

Nach der Xenotransplantation der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinie Ramos zeigten die NOD/SCID-Mäuse nach 40 Tagen ersten Symptome einer Lymphominfiltration in verschiedene Organe. Nach 80 Tagen waren alle unbehandelten Mäuse verstorben oder mussten aufgrund von Symptomen der Lymphominfiltration abgetötet werden (10/10, 100 %). Die Rituximab-Behandlung verlängerte das Gesamtüberleben der NOD/SCID-Mäuse signifikant ($p = 0,0009$) und es starb nur 10 % (1/10) der Mäuse. Dieses Modell zeigt erstmalig, dass die direkten Wirkungen von Rituximab auf B-NHL *in vivo* ausreichen, um die Tumorausbreitung zu verhindern.

Als IgG1-Isotypkontrolle wurden xenotransplantierten NOD/SCID-Mäuse mit dem anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Antikörper Cetuximab (20 mg / kg) behandelt. Die Cetuximab-Behandlung zeigte jedoch keinen Einfluss auf das Tumorwachstum der humanen B-NHL und das Gesamtüberleben der NOD/SCID-Mäuse, was die Spezifität der Rituximab-Wirkung *in vivo* bestätigt (Abb. 3.20).

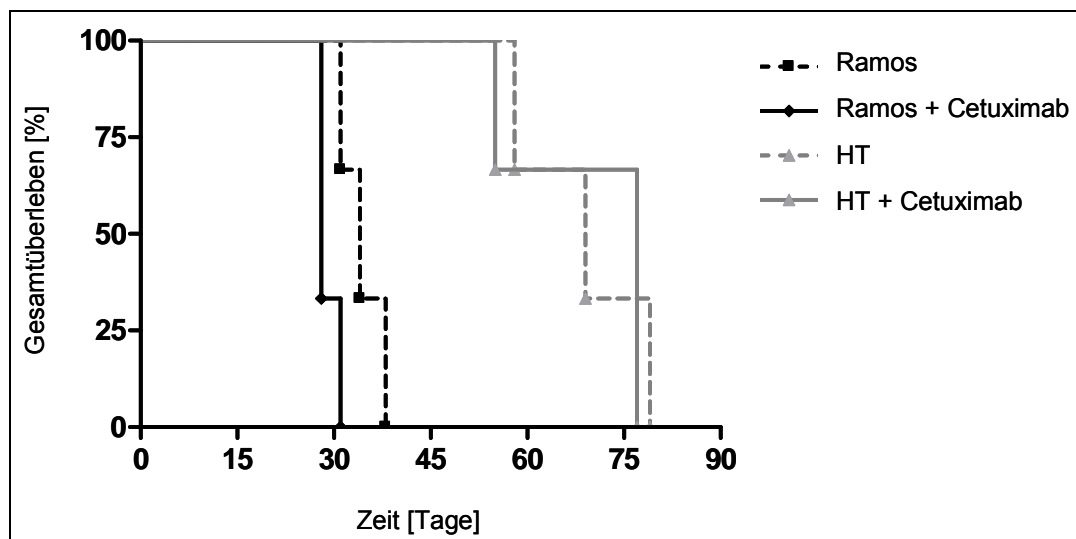


Abbildung 3.20 Behandlung der xenotransplantierten NOD/SCID-Mäuse mit der IgG1-Isotypkontrolle Cetuximab. 10^7 Zellen der B-NHL-Zelllinien Ramos und HT wurden i.v. in NOD/SCID-Mäuse injiziert, mit 20 mg / kg Cetuximab behandelt und das Gesamtüberleben verglichen ($n = 5$).

Vergleicht man die Kaplan-Meier-Überlebenskurven von den NOD/SCID-Mäusen, die mit der humanen Burkitt-Lymphomzelllinie Ramos xenotransplantiert wurden, mit denen von HT (DLBCL), konnte beobachtet werden, dass die Ramos-Zellen schneller in den NOD/SCID-Mäusen anwuchsen und zur Lymphomkrankheit führten. Dagegen war die Lymphomausbreitung der B-NHL-Zelllinie HT langsamer. Außerdem konnte bei der

Xenotransplantation der HT-Zellen in den NOD/SCID-Mäusen keine Infiltration des Rückenmarks und dadurch bedingte neurologische Störungen beobachtet werden.

3.2.3 Induktion von Resistenz gegenüber Rituximab durch Bcl-x_L *in vivo*

Das Rituximab-Behandlungsmodell der xenotransplantierten NOD/SCID-Mäuse wurde weiter verwendet, um den Einfluss der *in vitro* identifizierten Resistenzfaktoren *in vivo* zu untersuchen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L in den sensitiven B-NHL-Zelllinien Resistenz gegenüber Rituximab vermittelt. Um diesen Effekt von Bcl-x_L auf die direkten Wirkungen von Rituximab *in vivo* zu charakterisieren, wurden 10⁷ Zellen der Bcl-x_L-exprimierenden Ramos-Zellen in die NOD/SCID-Mäuse injiziert und mit Rituximab behandelt (Abb. 3.21).

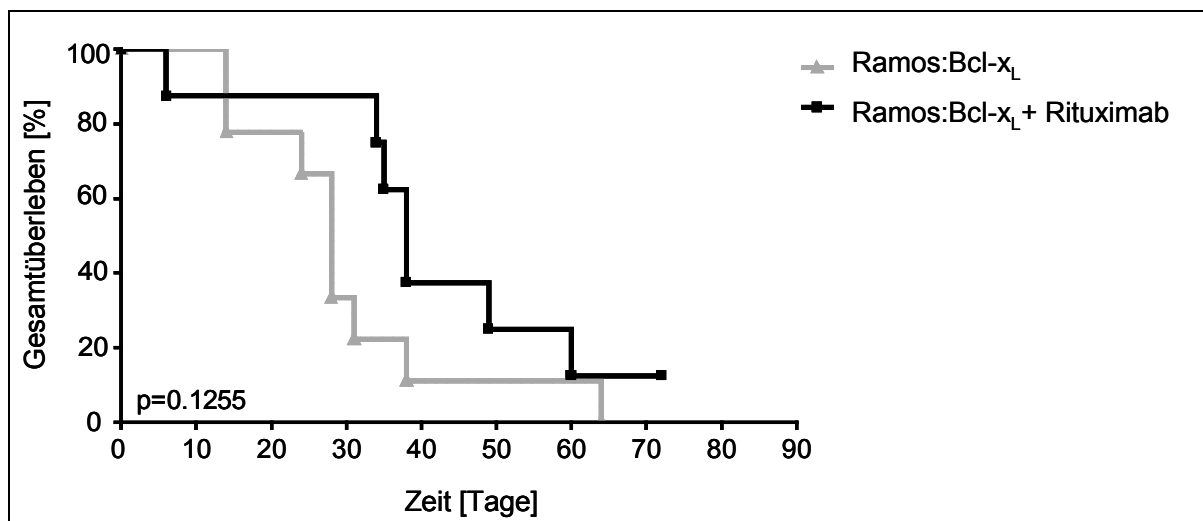


Abbildung 3.21 Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Bcl-x_L-exprimierende Ramos-Zellen xenotransplantiert in NOD/SCID-Mäusen mit Rituximab-Therapie. 10⁷ Bcl-x_L-exprimierende Ramos-Zellen wurden i.v. in NOD/SCID-Mäuse injiziert. Das Gesamtüberleben der mit Rituximab (20 mg / kg)-behandelten Mäuse wurde mit den unbehandelten Mäusen verglichen (p = 0,1255) (n = 10).

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Rituximab-behandelten und unbehandelten NOD/SCID-Mäuse, die mit Bcl-x_L-exprimierenden Ramos-Zellen xenotransplantiert wurden, zeigten eine aggressivere Lymphomausbreitung im Vergleich zu den parentalen Ramos-Zelle (Abb. 3.19). Die 50 %ige Überlebensrate der NOD/SCID-Mäuse betrug für die parentalen Ramos 45 Tagen und für die Bcl-x_L-exprimierenden Ramos nur 28 Tagen (p = 0,0103).

Des Weiteren wurde durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L in den Rituximab-sensitiven Ramos die therapeutische Wirkung von Rituximab *in vivo* vollständig aufgehoben. Die mit Rituximab-behandelten NOD/SCID-Mäuse zeigten eine vergleichbare Überlebenskurve wie die unbehandelten Mäuse ($p = 0,1255$). Mit diesem Modell konnte die *in vitro* identifizierte Resistenz gegenüber Rituximab, basierend auf der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L, *in vivo* bestätigt werden.

3.2.4 Sensitivierung Rituximab-resistenter B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome durch Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase *in vivo*

In dem vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie Resistenz gegenüber der Behandlung mit Rituximab auch *in vivo* induzieren können. Weiter sollte untersucht werden, wie intrinsisch resistente B-NHL gegenüber der Rituximab-Therapie *in vivo* wieder sensitiviert werden können.

Innerhalb der *in vitro*-Versuche konnte die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs als eine Ursache der intrinsischen Rituximab-Resistenz identifiziert werden. Mithilfe des PI3K-Inhibitors LY294002 konnte die Resistenz gegenüber Rituximab aufgehoben werden und die B-NHL-Zellen sensitiviert werden. Das B-NHL-Xenotransplantationsmodell in den NOD/SCID-Mäusen wurde verwendet, um diesen Ansatz auch *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurde die Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinie HT in NOD/SCID-Mäuse xenotransplantiert und die Mäuse mit einer Kombination aus Rituximab (20 mg / kg) mit LY294002 (20 mg / kg in PBS mit 10 % DMSO) behandelt (Abb. 3.22).

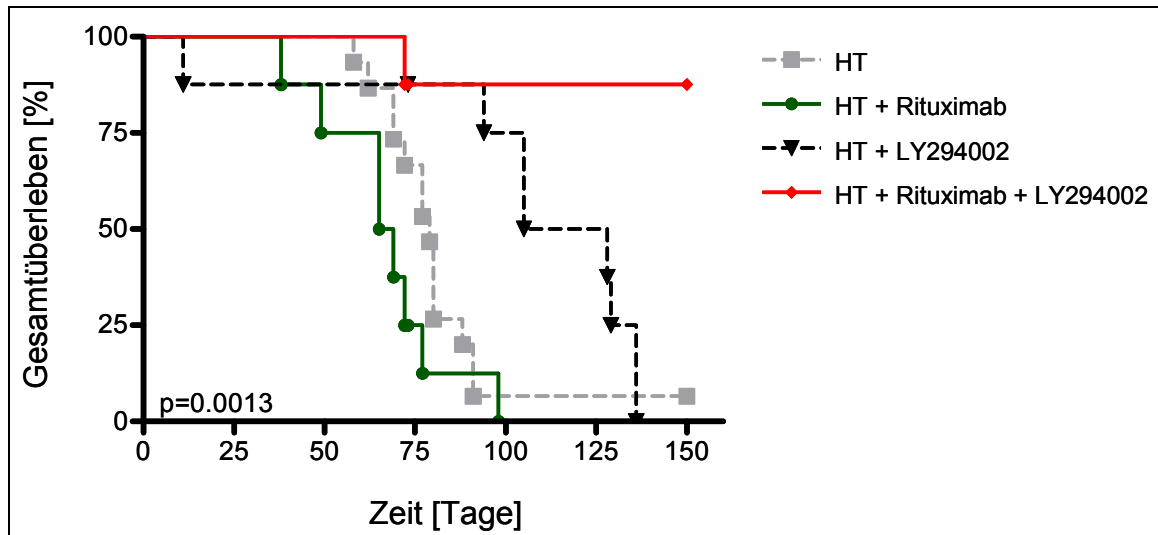


Abbildung 3.22 Kaplan-Meier-Überlebenskurven von NOD/SCID-Mäusen xenotransplantiert mit der Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinie HT und Behandlung mit der Kombination aus Rituximab mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. 10^7 HT-Zellen wurden in NOD/SCID-Mäuse xenotransplantiert. Von Tag 5 bis 10 wurden die Mäuse täglich und bis zum Versuchsende zweimal wöchentlich mit Rituximab (20 mg / kg), LY294002 (20 mg / kg) oder der Kombination aus Rituximab und LY294002 behandelt (n = 8).

Die Analyse der Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die Rituximab-resistente B-NHL-Zelllinie HT ergab, dass alle unbehandelten NOD/SCID-Mäuse (7/8, 87,5 %) nach 100 Tagen an den Symptomen der fortschreitenden Lymphomausbreitung verstorben waren. Ein vergleichbarer Verlauf wurde in der mit Rituximab behandelten Gruppe beobachtet (8/8, 100 %). Dies bestätigte, dass die *in vitro* als resistent identifizierte B-NHL-Zelllinie HT auch *in vivo* gegenüber der Behandlung mit Rituximab resistent ist.

Bei den NOD/SCID-Mäusen, die mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 alleine behandelt wurden, betrug die mediane Überlebenszeit 110 Tage und nach 135 Tagen waren alle Mäuse an der Lymphomerkkrankung verstorben (8/8, 100 %). Dieser therapeutische Effekt von LY294002 ist wahrscheinlich auf die Inhibition der konstitutiven Aktivierung des PI3K/-Akt-Signalwegs zurückzuführen. Die Kombination von Rituximab mit LY294002 unterdrückte hingegen fast vollständig die Lymphomerkkrankung (1/8, 12,5 %) und führte zu einem signifikant verbesserten Überleben der NOD/SCID-Mäuse im Vergleich zur Monotherapie mit Rituximab ($p = 0,0013$).

Diese Versuche bestätigten den *in vitro* identifizierten Resistenzmechanismus basierend auf der konstitutiven Aktivierung von Akt *in vivo*.

3.3 Expression von Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten

Zur weiteren Validierung der herausgearbeiteten Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab wurden korrelierende Untersuchungen an Biopsien von B-NHL-Patienten durchgeführt. Der Vergleich der Rituximab-sensitiven mit den –resistenten B-NHL-Zelllinien identifizierte die anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Mcl-1 sowie die konstitutive Phosphorylierung von Akt an Serin-473 als mögliche molekulare Ursachen der Rituximab-Resistenz.

Ob Bcl-x_L, Mcl-1 oder die Proteinkinase Akt auch mit dem Ansprechen von B-NHL-Patienten auf die Therapie mit Rituximab assoziiert sind, wurde anhand primärer Lymphknoten- und Knochenmarkbiopsien von B-NHL-Patienten untersucht. Alle Patienten waren mit Chemotherapie in Kombination mit Rituximab behandelt worden. Die Proteinexpression von Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 (Abb. 3.23) sowie von pAkt(Ser473) im Vergleich zu Akt (Abb. 3.24) wurde immunhistochemisch untersucht. Dabei wurde das Patientenkollektiv nach der Histologie in aggressive und indolente Lymphome unterteilt. Diese beiden Gruppen wurden weiter anhand des Therapieansprechens unterteilt, ob eine anhaltende Remission oder ein Rückfall nach der Rituximab-haltigen Kombinationstherapie vorlag.

Die Auswertung der immunhistochemischen Daten erfolgte mit dem IHC-Score nach Remmele (1987). Für die Darstellung wurde der *Box-and-whiskers*-Plot verwendet, wodurch die Verteilung des ausgewerteten IHC-Scores bezüglich des Median und der Quartile zeigt. Die statistische Auswertung der Expressionsunterschiede erfolgte mithilfe des t-Tests.

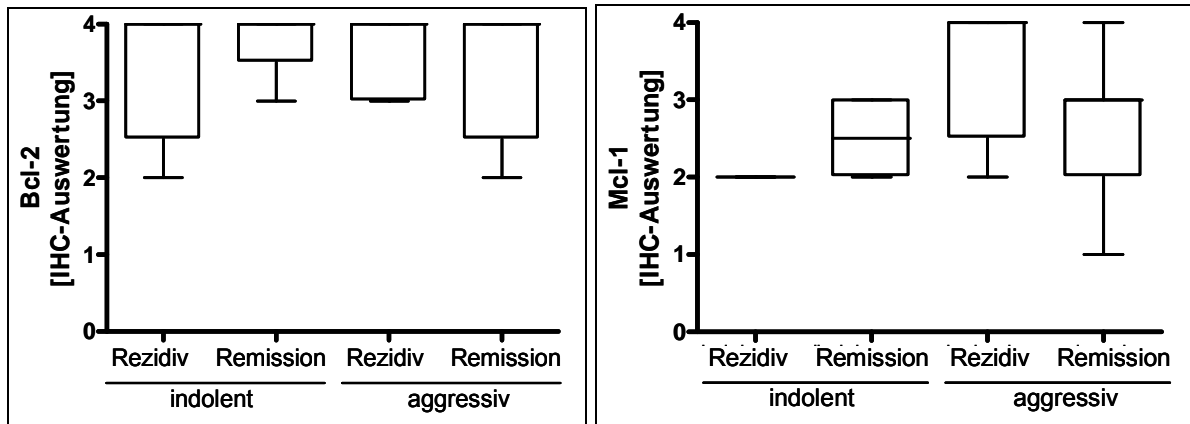


Abbildung 3.23 Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 bei B-NHL-Patienten. Die Patienten mit indolentem oder aggressivem B-NHL wurden mit einer Rituximab-haltigen Kombinationstherapie behandelt und befanden sich entweder in anhaltender Remission oder rezidierten nach der Therapie. Die Auswertung und Einteilung der Proteinexpression erfolgte anhand des IHC-Scores (nach Remmele, 1987) von 0 (keine Proteinexpression) bis 4 (starke Proteinexpression) verblindet durch einen Pathologen (n = 5 – 10).

Im Vergleich zu der gleichmäßig hohen Proteinexpression von Bcl-2 in den untersuchten B-NHL-Patientenproben, wurde eine höhere Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 in aggressiven B-NHL-Patienten gefunden, die auf die Rituximab-haltige Kombinationstherapie nicht angesprochen haben, als in Patienten, die von der Therapie anhaltend profitierten ($p = 0,08$).

Als weiterer möglicher Rituximab-Resistenzmechanismus wurde die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges identifiziert. Deshalb wurde bei dem gleichen Patientenkollektiv die Expression von phosphoryliertem, also aktivem Akt (pAkt(Ser473)) sowie als Kontrolle die Proteinexpression von Akt immunhistochemisch untersucht (Abb. 3.24).

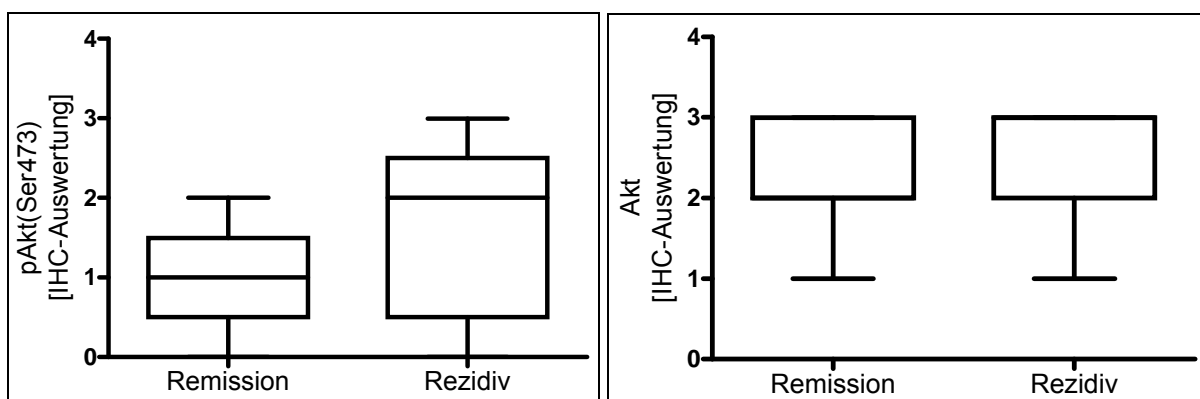


Abbildung 3.24 Auswertung der immunhistochemisch bestimmten Expression von phosphoryliertem Akt (pAkt(Ser473)) im Vergleich zu Gesamt-Akt in Biopsien von Patienten mit aggressivem B-NHL. Die untersuchten Patienten wurden mit einer Rituximab-Kombinationstherapie behandelt und die Aktivierung der Proteinkinase Akt in Patienten, die sich in anhaltender Remission befinden mit Patienten, die nach der Therapie rezidierten, verglichen (n = 8 – 10).

Die immunhistochemische Auswertung zeigte einen höheren Phosphorylierungsgrad von Akt, also eine stärkere Aktivierung, in Patienten mit einem Rückfall der Lymphomerkrankung (Rezidiv) nach der Rituximab-haltigen Therapie ($p = 0,176$). Als Kontrolle dazu wies die Gesamtproteinexpression von Akt keine Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen auf.

In den *in vitro* Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass das anti-apoptotische Protein Mcl-1 über den Akt-Signalweg reguliert werden kann. Auch bei der Auswertung der Patientenproben konnte eine erhöhte Mcl-1 Proteinexpression sowie eine gesteigerte Aktivität von Akt beobachtet werden. Der Vergleich der Expression von beiden möglichen Rituximab-Resistenzfaktoren in den B-NHL-Patientenproben, zeigte eine Korrelation der Proteinexpression des anti-apoptotischen Mcl-1 mit aktivem Akt (Abb. 3.25).

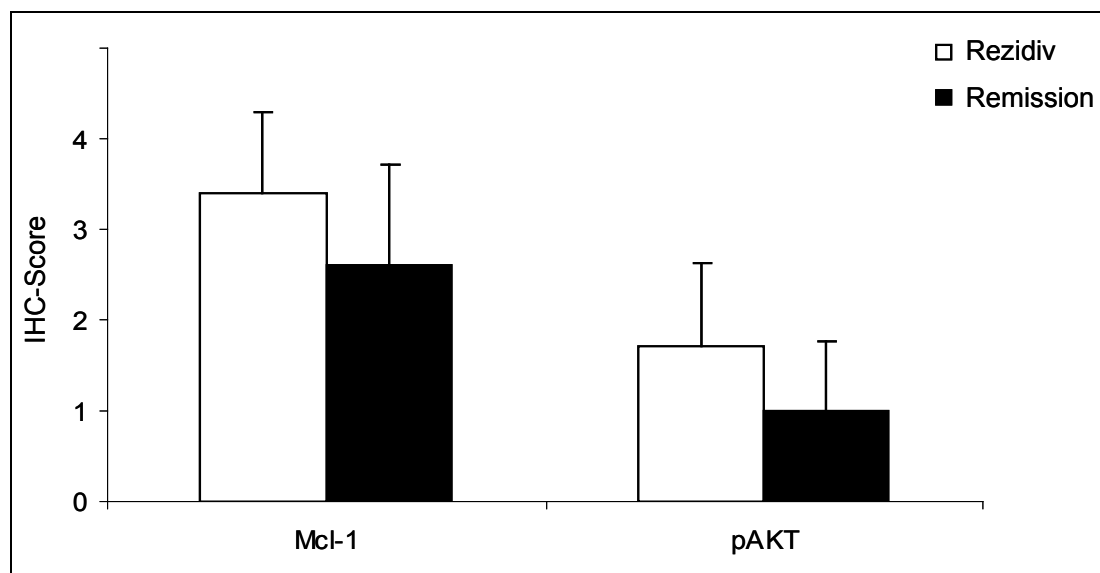


Abbildung 3.25 Korrelation der Proteinexpression von Mcl-1 mit dem Phosphorylierungsgrad von Akt in Patienten mit aggressivem B-NHL, die nach der Immunochemotherapie mit Rituximab entweder rezidierten oder sich in Remission befanden.

Die Analyse der Biopsieproben der B-NHL-Patienten, die innerhalb einer klinischen Studie mit einer Rituximab-Kombinationstherapie behandelt wurden, ergab somit, dass Rituximab-resistente, rezidivierende B-NHL-Patienten eine höhere Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 sowie eine stärkere Aktivierung der Proteinkinase Akt aufzeigten. Damit konnten die *in vitro* identifizierten Resistenzfaktoren gegenüber Rituximab *in vivo* sowie anhand von primärem B-NHL-Patientenmaterial bestätigt werden.

4 Diskussion

4.1 Direkte Rituximab-induzierte Wirkmechanismen

4.1.1 Rituximab-induzierte, intrazelluläre Signaltransduktion

B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome rangieren laut der Krebsstatistik des Robert-Koch-Institutes 2008 in Deutschland auf Rang acht der Krebsneuerkrankungen. Die Einführung des monoklonalen Antikörpers Rituximab hat die Therapieergebnisse bei B-NHL-Patienten erheblich verbessert. Allerdings sind vor allem die intrazellulären Wirkmechanismen von Rituximab bislang inkomplett verstanden. Es wird angenommen, dass die antitumoralen Wirkungen von Rituximab *in vivo* vor allem durch indirekte, immunologische Mechanismen, wie der Aktivierung des Komplementsystems (CDC) und Immuneffektorzellen (ADCC) bedingt ist (Cragg und Glennie, 2004; Fischer et al., 2006; Macor et al. 2007). Erste Untersuchungen über die direkten Wirkungen von Rituximab zeigten, dass es zur Modulation intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden kommt und die Sensitivierung der B-NHL-Zellen gegenüber Chemotherapie vor allem auf der Inhibition von anti-apoptotischen Proteinen und Wachstumsfaktorsignalwegen basiert (Jazirehi et al., 2005; Vega et al., 2006).

Nur 70 - 80 % der B-NHL-Patienten sprechen auf eine Kombinationstherapie mit Rituximab an (Coiffier et al. 2002). Um Mechanismen der Resistenz gegenüber Rituximab aufzuklären und hierdurch die Therapie von B-NHL-Patienten zu verbessern, müssen die Rituximab-induzierten intrazellulären Signalwege vollständig charakterisiert sein.

Bisher konnte gezeigt werden, dass es nach Bindung von Rituximab an sein Antigen CD20 zur Translokation von CD20 in cholesterolreiche Membranmikrodomänen (*lipid rafts*) kommt (Bezombes et al., 2004; Cragg et al., 2003). Die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung von Rituximab an CD20 erfolgt über die Src-Tyrosinkinasen Lyn, Syk, Fyn und Lck weiter zur Phospholipase-C γ 2 (Deans et al., 1995; Janas et al., 2005; Semac et al., 2003). Das durch die Aktivität der PL-C γ 2 entstehende Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) führt zur Öffnung von Calciumkanälen im endoplasmatischen Retikulum (Walshe et al., 2008; Unruh et al., 2005). Durch die Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration werden SOC (*store-operated cation*)-Kanäle, zu denen wahrscheinlich auch CD20 gehört, in der Zellmembran geöffnet (Polyak und Deans, 2002; Polyak et al., 2008). Entsprechend der Koloalisation von CD20 mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR) auf der Zelloberfläche wurde auch die Induktion der

BCR-Signaltransduktion nach Rituximab-Behandlung *in vitro* beschrieben (Janas et al., 2005; Walshe et al., 2008).

Vor allem durch die Arbeitsgruppe von B. Bonavida (UCLA, USA) konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die chemosensitivierende Wirkung von Rituximab auf der Inhibition von konstitutiv aktiven, intrazellulären Signalwegen, wie beispielsweise der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Suzuki et al., 2007; Wanner et al., 2006), NF- κ B (Jazirehi et al., 2005; Vega et al., 2005; Jazirehi et al., 2004a), Raf-1/MEK1/2-ERK1/2 (Jazirehi et al., 2004b), p38 MAPK (Vega et al., 2004; Vega et al., 2002; Vega et al., 2006) und Proteinkinase-C ζ (Leseux et al., 2008) beruhen kann. Allerdings wurden diese Experimente nur anhand von B-NHL-Zellkulturen *in vitro* durchgeführt und weder durch Untersuchungen *in vivo* anhand von Mausmodellen sowie an primärem B-NHL-Patientenmaterial bestätigt. Ferner beziehen sie sich vor allem auf die Charakterisierung der Kombinationstherapie von Rituximab mit verschiedenen Zytostatika.

Die Änderung der globalen Genexpression nach Bindung von Rituximab wurde mithilfe einer genomweiten Expressionsanalyse in den B-NHL-Zelllinien DHL4 (DLBCL) und BJAB (Burkitt-Lymphom) von Cittera et al. (2005) analysiert. Dabei konnte die Induktion der G-Proteine RGS1 und RGS2, der Transkriptionsfaktoren AP-1, JunB und Fos sowie der Phosphatase DUSP2 beobachtet werden und bestätigte die Modulation der MAPK-Signalwege durch Rituximab. Auch eine kürzlich veröffentlichte Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie, bei der unbehandelte Zellextrakte der B-NHL-Zelllinie SU-DHL-4 mit Rituximab-behandelten Zellextrakten verglichen wurden, bestätigte, dass Rituximab intrazellulär Proteine reguliert, die an Signalwegen der Apoptose, Zellzyklus und dem MAPK- sowie NF- κ B-Signalweg beteiligt sind (Everton et al., 2008).

Um die intrazelluläre Signaltransduktion nach Rituximab-Behandlung in den verwendeten B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ramos, Jeko-1 und HT zu charakterisieren und mit der vorhandenen Literatur zu vergleichen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK sowie des PI3K/Akt-Signalweges durch Rituximab untersucht. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Rituximab *in vitro* eine Aktivierung der MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK induziert (Abb. 3.15). Dies bestätigt die Arbeiten von Pedersen et al. (2002), der anhand primärer B-CLL-Patientenproben die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK durch Rituximab nachweisen konnten. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von B. Bonavida, dass Rituximab die konstitutive Aktivierung des MAPK-, PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalweges in den B-NHL-Zelllinien Raji, 2F7, Ramos und Daudi

inhibiert, konnten dagegen nicht bestätigt werden (Jazirehi et al., 2004b; Jazirehi et al., 2005; Suzuki et al., 2007; Vega et al., 2004).

Bei der Analyse des PI3K/Akt-Signalweges wurde die Aktivierung von Akt durch Rituximab anhand der Phosphorylierung an Threonin-308 und Serin-473 nachgewiesen. Nach der Aktivierung der Lipidkinase PI3K kommt es zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) und zur Aktivierung der Proteinkinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) und Akt. Für eine vollständige Aktivierung von Akt muss Ser473, lokalisiert in der hydrophoben Domäne, und Thr308, lokalisiert im katalytischen Zentrum, phosphoryliert vorliegen (James et al., 1996; Andjelkovic et al., 1999; Brodbeck et al., 1999; Alessi et al., 1996). Ferner wird Akt durch die Proteinphosphatase PP2A und PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*) wieder inaktiviert (Andrabi et al., 2007; Gao et al., 2005; Haystead et al., 1989).

Die Behandlung mit Rituximab führte in allen von uns untersuchten B-NHL-Zellen zur aktivierenden Phosphorylierung an Thr308 durch PDK1. Das bedeutet, dass Rituximab die PI3K aktiviert und PIP₃ katalysiert wird. Akt bindet mit seiner PH (*pleckstrin homology*)-Domäne das PIP₃ an der Zellmembran und wird dadurch in räumliche Nähe zu der Proteinkinase PDK1 gebracht phosphoryliert (Alessi et al., 1997; Walker et al., 1998; Stephens et al., 1998; Le Good et al., 1998). Rituximab modulierte jedoch nicht die Aktivität der PDK1 in den B-NHL-Zelllinien. Allerdings muss PDK1 nicht in der aktiven Form vorliegen, um Akt zu phosphorylieren (Andjelkovic et al., 1999; Anderson et al., 1998; Sato et al., 2000).

Die Lipidphosphatase PTEN antagonisiert diesen Prozess durch die Katalyse von PIP₃ zu PIP₂. Mutationen oder der vollständige Verlust von PTEN wurden in verschiedenen Tumorarten, auch in B-NHL, beschrieben und führen zur konstitutiven Aktivierung des Proliferationssignals durch Akt (Trotman et al., 2006; Li et al., 1997; Steck et al., 1997; Lenz et al., 2008; Sakai et al., 1998; Cully et al., 2006). In den beiden B-NHL-Zelllinien Jeko-1 und HT wurde ein Verlust des Tumorsuppressors PTEN gefunden (Abb. 3.17B). In diesen Zellen kann PIP₃ nicht abgebaut werden und Akt ist somit konstitutiv aktiv.

Allerdings erfordert die vollständige Aktivierung von Akt auch die Phosphorylierung an Ser473 durch den mTOR/Rictor-Komplex (mTORC2) (Sarbasov et al., 2005; Ikenoue et al., 2008; Guertin et al., 2006; Shiota et al., 2006; Yang et al., 2006). Wie die Aktivität von mTORC2 reguliert wird, ist bisher unbekannt, aber es wird ein PI3K-anhängiger Signalweg diskutiert (Ikenoue et al., 2008).

In den hier untersuchten B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos führte die Bindung von Rituximab nicht zur Phosphorylierung von Akt an Ser473. In diesen Zellen scheint somit das proliferationsaktivierende und anti-apoptotische Signal von Akt blockiert zu sein. Rituximab kann in diesen B-NHL-Zellen Apoptose induzieren und das Zellwachstum inhibieren. Dagegen ist Akt in den B-NHL-Zelllinien Jeko-1 und HT an Ser473 konstitutiv phosphoryliert. Diese aktivierende Phosphorylierung wird durch die Behandlung mit Rituximab teilweise sogar noch verstärkt. Das zeigt, dass in diesen Rituximab-resistenten B-NHL das Apoptose-induzierende Signal von Rituximab blockiert ist (Abb. 3.15).

Zur Bestätigung konnte die Aktivität von Akt anhand der Phosphorylierung des Zielmoleküls GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) nachgewiesen werden. In den B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos ist GSK3 β entweder nicht phosphoryliert oder die Phosphorylierung wurde durch Rituximab gehemmt. Dagegen wird die Phosphorylierung von GSK3 β in den Zelllinien Jeko-1 und HT durch Rituximab nicht beeinflusst (Abb. 3.15). Dies weist darauf hin, dass die Proteinkinase Akt in diesen B-NHL-Zellen konstitutiv aktiv ist und nicht durch Rituximab moduliert wird. Die Proteinkinase GSK3 β phosphoryliert das anti-apoptotische Protein Mcl-1, welches nach Phosphorylierung proteasomal degradiert wird (Maurer et al., 2006). Ist Akt konstitutiv aktiv, wird GSK3 β phosphoryliert und damit inhibiert. Was zu einer längeren Halbwertszeit des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 führt und eine Apoptoseresistenz nach sich ziehen kann.

Damit konnte gezeigt werden, dass Rituximab den PI3K/Akt-Signalweg moduliert. Da bei einem Teil der untersuchten B-NHL-Zelllinien aufgrund eines PTEN-Verlustes Akt konstitutiv aktiv ist, ist in diesen B-NHL-Zellen die Rituximab-induzierte Apoptose aufgehoben. Diese Ergebnisse widersprechen den Arbeiten von Suzuki et al. (2007), die anhand von Rituximab-resistenten Klonen der B-NHL-Zelllinien Ramos und Daudi zeigen konnten, dass Rituximab die konstitutive Aktivierung von Akt in diesen Zellen *in vitro* inhibierte. Allerdings wurden B-NHL-Zellklone mit sekundärer Rituximab-Resistenz verwendet, die durch Kultivierung mit suboptimalen Rituximab-Konzentrationen *in vitro* gewonnen wurde.

Bei der Behandlung der B-NHL-Zellen mit Rituximab *in vitro* konnte ferner eine direkte Modulation der Stresskinasen p38 und JNK beobachtet werden (Abb. 3.15). Diese beiden MAPK regulieren unter anderem die Transkriptionsfaktoren AP-1 (Jun, Fos), ETS (*erythroblast transformation specific*) und NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), wodurch eine pro-apoptotische Stressantwort in der Zelle ausgelöst wird (Xia et al., 1995; Ichijo et al., 1997). Außerdem wirken beide Proteinkinasen direkt auf pro- und anti-

apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie. Beispielsweise kann JNK direkt Bax aktivieren oder ERK1/2 durch Phosphorylierung von Mcl-1 die Degradation dieses anti-apoptotischen Proteins einleiten (Tournier et al., 2000; Townsend et al., 1998).

Auf welche Weise die Rituximab-induzierte, intrazelluläre Signaltransduktion die intrinsische Apoptose beeinflusst, ist bisher unbekannt. Aber die zentralen Signaltransduktionswege der MAPK p38, JNK und ERK1/2 sowie der PI3K können regulatorisch auf die Apoptose wirken (Brunet et al., 1999; Cardone et al., 1998; delPeso et al., 1997; Datta et al., 1997; Dijkers et al., 2002; Maurer et al., 2006).

4.1.2 Rituximab-induzierte Apoptose

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der MAPK- und PI3K-Signalweg durch Rituximab beeinflusst wird, wurde die Rituximab-induzierte Apoptose in B-NHL-Zelllinien *in vitro* weiter charakterisiert. Die bisher veröffentlichten Daten zur Rituximab-induzierten Apoptose sind sehr kontrovers und beschreiben diese entweder als Caspasen-abhängig (Unruh et al., 2005; Byrd et al., 2002; Chow et al., 2002) oder Caspasen-unabhängig (van der Kolk et al., 2002; Daniels et al., 2008; Turzanski et al., 2008; Stanglmaier et al., 2004; Chan et al., 2003; Stel et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität verschiedener B-NHL-Zelllinien gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose *in vitro* bestimmt. Die verwendeten B-NHL-Zelllinien repräsentierten verschiedene histologische B-NHL-Subtypen, wie das diffus großzellige Lymphom, das Mantelzelllymphom, das Burkitt-Lymphom, das follikuläre Lymphom oder die B-Zell-chronisch-lymphatische Leukämie. Behandelt wurden die B-NHL-Zelllinien *in vitro* mit monomerem und quervernetztem Rituximab. Die Quervernetzung von Rituximab erfolgte mit einem sekundären, anti-human Fc-Immunglobulin F(ab')₂-Fragment. Dies spiegelt die *in vivo* vorkommende Quervernetzung durch Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immuneffektorzellen wider und konnte die direkte Apoptoseinduktion verstärken.

Bei der weiteren Charakterisierung des Rituximab-induzierten Apoptosesignalwegs in den B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ramos und WSU-NHL konnte nachgewiesen werden, dass es durch Rituximab zur Depolarisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials, zum Ausstrom von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Membranzwischenraum in das Zytoplasma und zur Aktivierung von Caspasen kommt (Abb. 3.6., 3.8, 3.10). Die vollständige

Inhibition der Rituximab-induzierten Apoptose durch den Caspaseninhibitor zVADfmk bestätigte in dem verwendeten Modell, dass der Rituximab-induzierte Zelltod Caspasen-abhängig ist (Abb. 3.7A) und widerspricht damit Arbeiten über Rituximab-induzierten, Caspasen-unabhängigen Zelltod (Daniels et al., 2008; Stanglmaier et al., 2004; Turzanski et al., 2008).

Der extrinsischen Apoptosesignalwegs wird in dem verwendeten Modell durch Rituximab nicht induziert. Dies konnte mittels Expression einer dominant-negativen Mutante von FADD (DN-FADD, *Fas-associated protein with death domain*), welche die Ausbildung des essentiellen DISC (*death-inducing signaling complex*) verhindert, in den B-NHL-Zellen nachgewiesen werden. Nach Behandlung der DN-FADD-exprimierenden B-NHL-Zellen mit Rituximab war die Apoptoserate vergleichbar zur Kontrolle (Abb. 3.14A). Dies widerspricht den Arbeiten von Stel et al. (2007), dass die Bindung von Rituximab an CD20 zur Clusterbildung des Todesrezeptors Fas (CD95, DR2), zur Rekrutierung von FADD, zur DISC-Bildung und zur Aktivierung von Caspase-8 führt. Diese beiden kontroversen Ergebnisse über die Induktion von extrinsischer Apoptose durch Rituximab beruhen wahrscheinlich darauf, dass der extrinsische Apoptosesignalweg entweder auf Ebene von FADD oder der Caspase-8 inhibiert wurde und verschiedene B-NHL *in vitro* Modelle verwendet wurden.

In den untersuchten B-NHL-Zellen induziert Rituximab Apoptose über den intrinsischen Signalweg, der zur Depolarisierung der äußeren mitochondrialen Membran, zur Apoptosombildung und zur Caspasenaktivierung führt. Die Regulation der „mitochondrialen“ Apoptose erfolgt durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie. Dabei werden die pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine der Bcl-2-Familie spezifisch durch extra- oder intrazelluläre Signale induziert. Beispiele hierfür sind die Aktivierung von Bim über den B- und T-Zell-Rezeptorsignalweg, von Puma und Noxa durch das Tumorsuppressorprotein p53 oder die Spaltung von Bid in tBid (*truncated Bid*) durch die Caspase-8 (Bouillet et al., 1999; Chipuk et al., 2004; Strasser et al., 2000). Verschiedene Theorien erklären den molekularen Mechanismus, wie pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie mithilfe ihrer BH3-Domänen miteinander interagieren und sich dadurch inhibieren oder aktivieren (Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005; Certo et al., 2006). Des Weiteren wird die Regulation der BH1-2-3-Proteine Bak und Bax sowie die Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch Homo- und Heterodimerisierung diskutiert (Spierings et al., 2005; Green und Reed, 1998; Chipuk et al., 2004). Eine weitgehend akzeptierte Theorie beschreibt die direkte Aktivierung von Bak und Bax durch die BH3-*only* Proteine Bim und

tBid (Aktivatoren) sowie deren indirekte Aktivierung über die Inhibition der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 durch Bik und Bad (Sensitivierer) (Martinou und Green, 2001; Kim et al., 2006; Li und Yuan, 1998; Certo et al., 2006). Bisher ist unbekannt, ob Rituximab die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert und wie die intrinsische Apoptose induziert wird.

Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss von Rituximab auf die Regulation der Bcl-2-Familie auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Diese Analysen zeigten, dass die pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine Bik, Bim, Bad und Bid transkriptionell und translational durch Rituximab induziert wurden, während das anti-apoptotische Protein Mcl-1 durch die Behandlung herunterreguliert wurde (Abb. 3.12, 3.13). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rituximab die Bcl-2-Proteinfamilie beeinflusst und wahrscheinlich darüber Apoptose induziert.

Die zentrale Rolle der Bcl-2-Proteinfamilie für die Sensitivität von B-NHL gegenüber Rituximab wurde durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L in den B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ramos und WSU-NHL *in vitro* und *in vivo* bestätigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Bcl-x_L die Induktion von Apoptose durch Rituximab vollständig inhibiert (Abb. 3.14B). Zusammenfassend zeigt diese Charakterisierung der Rituximab-induzierten Apoptose somit, dass Rituximab durch die Modulation der Bcl-2-Proteinfamilie den intrinsischen Signalweg der Caspasenaktivierung induziert.

4.2 Molekulare Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab

4.2.1 Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose

Tumorzellintrinsische Resistenzmechanismen gegenüber verschiedenen Tumortheraeutika basieren größtenteils auf einer verstärkten Expression von anti-apoptotischen Proteinen oder der konstitutiven Aktivierung von Proliferationssignalwegen (Igney und Krammer, 2002; Bader et al., 2005). Außerdem spielen bei der zielgerichteten Tumorthherapie mit spezifischen Proteinkinase-Inhibitoren oder therapeutischen Antikörpern die Expression und Erkennung des Zielmoleküls eine wichtige Rolle. Beides kann durch molekulare, tumorzellintrinsische Mechanismen beeinflusst und verändert werden, wodurch es zu Resistenzen gegenüber den zielgerichteten Tumorthapien kommen kann (Imai und Takaoka, 2006).

Bei den Untersuchungen zur direkten Induktion von Apoptose durch Rituximab in den B-NHL-Zelllinien wurde beobachtet, dass 54 % (7/13) der untersuchten Zelllinien eine primäre, intrinsische Resistenz gegenüber Rituximab aufweisen (Abb. 3.2). Diese Resistenz bestand auch gegenüber den indirekten, immunologischen Effekten, der ADCC und CDC (Abb. 3.3). Allerdings korreliert sie nicht mit der CD20-Expression auf der Zelloberfläche der B-NHL (Abb. 3.4). Das bedeutet, dass diese Resistenz gegenüber Rituximab wahrscheinlich auf molekularen, intrazellulären Mechanismen basiert.

Dieser Theorie widersprechen die Beobachtungen von Winiarska et al. (2008), die nachweisen konnten, dass Statine, Inhibitoren der Cholesterolsynthese in der Zellmembran, die Konformation von CD20 ändern können und dadurch die Bindung von Rituximab an CD20 und die Induktion von CDC und ADCC verhindert wurde. Ähnliche Arbeiten zeigten eine Korrelation der Expression des *lipid raft*-assoziierten Gangliosids GM1 mit der Rituximab-Sensitivität (zum Büschenfelde et al., 2008). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Sensitivität gegenüber Rituximab auch auf der Translokation von CD20 in die Membranamikrodomänen korrelieren kann.

Weitere Arbeiten zeigen eine Korrelation der CD20-Expression mit der Sensitivität gegenüber Rituximab. Mankai et al. (2008) erklären damit die geringere therapeutische Effektivität von Rituximab in B-CLL-Patienten und konnten nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor PU.1 (*purine-rich box-1*) die Expression von CD20 reguliert. In den untersuchten B-CLL-Patientenproben waren das PU.1-Gen hypermethyliert und dadurch die Genexpression reduziert.

In den untersuchten B-NHL-Zelllinien korrelierte die Rituximab-Sensitivität *in vitro* jedoch nicht mit der CD20-Oberflächenexpression (Abb. 3.4). Dagegen konnte nachgewiesen werden, dass die Sensitivität gegenüber Rituximab mit der Sensitivität gegenüber dem Pan-Kinaseinhibitor Staurosporin korreliert, von dem bekannt ist, dass er Apoptose über den intrinsischen Signalweg induziert (Abb. 3.5). Dies wies darauf hin, dass die Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinien eventuell eine intrinsische Apoptoseresistenz aufweisen. Die Analyse des intrinsischen Apoptosesignalwegs in den Rituximab-sensitiven B-NHL-Zellen SU-DHL-4, Ramos und WSU-NHL sowie den Rituximab-resistenten B-NHL Jeko-1, HT und Sc-1 zeigte, dass in den resistenten B-NHL-Zellen durch Rituximab keine Caspasen aktiviert wurden (Abb. 3.6). Des Weiteren konnte keine Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma und keine Depolarisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials beobachtet werden (Abb. 3.8, 3.10).

Die durchgeführten Analysen zur Rituximab-induzierten Apoptose weisen somit auf eine Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie durch Rituximab hin, da diese Proteinfamilie die Integrität der Mitochondrienmembran während der Apoptose kontrolliert. Der Vergleich der Proteinexpression pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie in Rituximab-sensitiven und resistenten B-NHL-Zellen zeigte eine konstitutiv erhöhte Expression von anti-apoptotischem Mcl-1, Bcl-x_L und Bfl-1 in den resistenten sowie von pro-apoptotischem Bik, Bid und Bim in den sensitiven B-NHL-Zelllinien (Abb. 3.11). Diese Beobachtungen korrelieren mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, bei den die anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 oder Bfl-1 Resistenz gegenüber Rituximab vermitteln (Brien et al., 2007; Hussain et al., 2007).

Die entscheidende Rolle der Bcl-2-Proteinfamilie bei der Rituximab-induzierten Apoptose und der Resistenzentstehung konnte durch Untersuchungen zur Kombination von Rituximab mit dem BH3-Mimetikum ABT-737 weiter untermauert werden. Dabei konnten Rituximab-resistente B-NHL-Zellen gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose *in vitro* sensitiviert werden (Abb. 3.16). Die sensitivierende Wirkung von ABT-737 beruht auf der Inhibition der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L (Oltersdorf et al., 2005; Konopleva et al., 2006; van Delft et al., 2006).

Die indirekten, immunologischen Wirkmechanismen ADCC und CDC wurden bisher immer als die entscheidenden antitumoralen Mechanismen von Rituximab *in vivo* angenommen. Anhand eines humanen B-NHL-Xenotransplantationsmodells in immuninkompetenten NOD/SCID-Mäusen konnte erstmalig gezeigt werden, dass die direkten Wirkungen von Rituximab auf die B-NHL-Zellen auch *in vivo* relevant sind. Bei der Xenotransplantation der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinie Ramos zeigten alle Mäuse innerhalb von 80 Tagen Symptome einer fortschreitenden B-NHL-Ausbreitung. Durch die Behandlung mit Rituximab überlebten hingegen 90 % (9/10) der Mäuse die B-NHL-Xenotransplantation (Abb. 3.19). Dieser therapeutische Effekt von Rituximab in dem verwendeten *in vivo*-Modell basierte ausschließlich auf direkten antitumoralen Wirkungen von Rituximab und war ausreichend, um die Tumorausbreitung zu verhindern. Die indirekten Wirkmechanismen ADCC und CDC konnten aufgrund der Immuninkompetenz der NOD/SCID-Mäuse sowie deren Vorbehandlung ausgeschlossen werden.

Auch in diesem *in vivo* Modell hebt die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L die therapeutische Wirkung von Rituximab auf (Abb. 3.21). Die Rolle der anti-apoptischen Proteine der Bcl-2-Familie wurde weiterhin anhand von B-NHL-Patientenproben, die mit

Rituximab behandelt wurden, bestätigt. Es zeigte sich, dass anti-apoptotisches Bcl-x_L und Mcl-1 in rezidivierenden Patienten, die nicht auf die Rituximab Therapie ansprachen, höher exprimiert waren, als in Patienten mit einer anhaltenden Remission, die nach der Rituximab-haltigen Therapie rezidivfrei blieben (Abb. 3.23).

4.2.2 Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab-induzierter intrazellulärer Signaltransduktion

Bei der Analyse der Rituximab-induzierten Modulation der intrazellulären Signalwege von den MAPK p38, JNK und ERK1/2 sowie von PI3K/Akt konnte gezeigt werden, dass Rituximab die Aktivität dieser Signalwege beeinflusst. Des Weiteren zeigte der Vergleich der Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und Ramos und Rituximab-resistenten Jeko-1 und HT, dass nur in den Rituximab-sensitiven B-NHL-Zellen die Stresskinase JNK durch Rituximab aktiviert wurde. Die resistenten B-NHL wiesen dagegen eine konstitutive Aktivierung der Proteinkinase Akt auf, die als eine Ursache der bestehenden intrinsischen Resistenz gegenüber Rituximab identifiziert wurde (Abb. 3.15).

Die Xenotransplantation der Rituximab-resistenten B-NHL-Zelllinie HT in immuninkompetente NOD/SCID-Mäuse bestätigte deren konstitutive Rituximab-Resistenz auch *in vivo*. Rituximab zeigte keinen therapeutischen Effekt bei der Behandlung von NOD/SCID-Mäusen, die mit HT xenotransplantiert wurden. Durch die Kombination von Rituximab mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 konnten die resistente B-NHL-Zelllinie HT *in vitro* und *in vivo* gegenüber Rituximab sensitiviert werden. Die B-NHL-Ausbreitung in den Mäusen konnte mit dieser Kombinationstherapie fast vollständig verhindert werden (12,5 %, 1/8) (Abb. 3.22).

Damit konnte *in vivo* bestätigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges Resistenz gegenüber Rituximab *in vitro* und *in vivo* induziert. Die Auswertung der primären Proben von B-NHL-Patienten, die mit Rituximab behandelt worden waren, zeigte außerdem eine stärkere Aktivierung von Akt in den rezidivierenden Patienten im Vergleich zu den Patienten in anhaltender Remission (Abb. 3.24). Diese erhöhte Aktivierung von Akt korrelierte mit der höheren Expression von anti-apoptotischem Mcl-1 und deutet auf eine Verbindung der beiden identifizierten, zentralen Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab hin (Abb. 3.25).

4.2.3 Vergleich mit bestehenden Theorien zur Rituximab-Resistenz

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass die Resistenz gegenüber Rituximab-induzierter Apoptose auf den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie sowie auf dem konstitutiv aktiven PI3K/Akt-Signalweg beruhen kann. In den untersuchten Rituximab-sensitiven B-NHL-Zelllinien wurde Apoptose vermutlich über die Induktion der pro-apoptotischen BH3-only Proteine Bik, Bid und Bim sowie über die Aktivierung der Stresskinase JNK induziert (Abb. 4.1A). Dagegen wurde in den resistenten B-NHL-Zellen die Rituximab-induzierte Apoptose durch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Mcl-1 sowie durch die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges inhibiert (Abb. 4.1B).

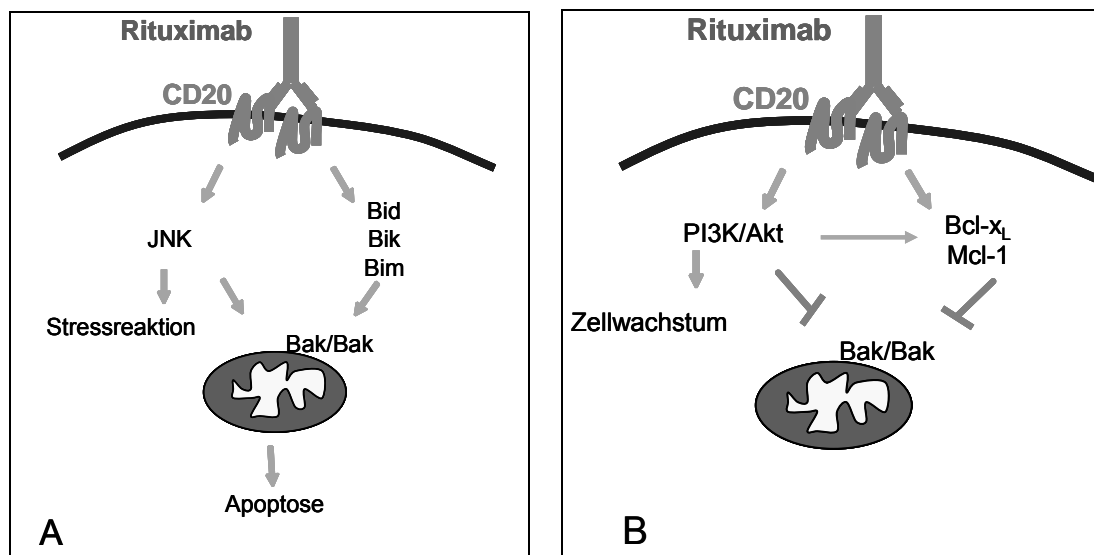


Abbildung 4.1 Vergleich der Rituximab-induzierten Apoptose in den sensiblen (A) und resistenten (B) B-NHL-Zelllinien. (A) Rituximab induziert den intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweg über die Induktion der pro-apoptotischen BH3-only Proteine Bid, Bik und Bim sowie über die Aktivierung des JNK-Signalweges. (B) In den Rituximab-resistenten B-NHL wird die Apoptoseinduktion durch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Mcl-1 sowie über die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges inhibiert.

Bestehende Hypothesen zu den molekularen Ursachen einer Rituximab-Resistenz beschreiben entweder die verminderte CD20-Expression, CD20-Konformation oder CD20-Translokation in die Membranmikrodomänen ‚lipid rafts‘. Weitere Theorien beschäftigen sich vor allem mit sekundären Resistenzen gegenüber Rituximab nach vorangegangener Rituximab-Therapie (Bannerji et al., 2003; Czuczman et al., 2008; Jazirehi et al., 2007; Mankai et al., 2008; Müller et al., 2008; zum Büschenfelde et al., 2008; Winiarska et al., 2008). Das innerhalb der vorgelegten Arbeit entstandene Modell der Rituximab-Resistenz beschreibt erstmalig die

primäre, zellintrinsische Resistenz von B-NHL gegenüber Rituximab basierend auf anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie und dem PI3K/Akt-Signalwegs.

Zwei weitere Theorien der Arbeitsgruppen von B. Bonavida (UCLA, USA) und von M.S. Czuczman (Roswell Park Cancer Institute, New York, USA) beschäftigen sich ausschließlich mit der sekundären, zellintrinsischen Resistenz gegenüber Rituximab mithilfe von *in vitro*-Modellen. Dabei erzeugte die Arbeitsgruppe von B. Bonavida artifiziell Rituximab-resistente B-NHL-Subklone aus den sensitiven B-NHL-Zelllinien Daudi und Ramos durch Langzeitkultivierung mit suboptimalen Rituximab-Konzentrationen. Die Analyse dieser Rituximab-resistenten Klone zeigte, dass sie gegenüber direkter Rituximab-induzierter Apoptose sowie gegenüber CDC, ADCC und Zytostatika resistent waren. Das zeigte das Vorkommen einer Kreuzresistenz gegenüber direkten und indirekten Wirkmechanismen von Rituximab sowie gegenüber Chemotherapie. Diese Resistenz basierte auf einer konstitutiven Aktivierung der NF- κ B-, PI3K- und ERK1/2-Signalwege, wodurch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 induziert wurden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse dadurch, dass die resistenten Klone durch Inhibition der konstitutiv aktiven, intrazellulären Signalwege mithilfe des NF- κ B-Inhibitors DHMEQ (Dehydroxymethylepoxyquinomicin), des Proteasom-Inhibitors Bortezomib oder des MEK1/2-Inhibitors PD98059 gegenüber Rituximab sensitiviert werden konnten. Außerdem konnten diese resistenten B-NHL-Klone nicht mehr durch Rituximab gegenüber Chemotherapeutika sensitiviert werden (Bonavida, 2007; Jazirehi et al., 2007; Suzuki et al., 2007).

Die Arbeitsgruppe von M.S. Czuczman identifizierte in Rituximab-resistenten Klonen der B-NHL-Zelllinien Raji, RL und SUDHL-4 eine geringere CD20 Gen- und Proteinexpression. Dabei wurde eine veränderte CD20-Proteinstruktur, eine Umordnung der Membranmikrodomänen (LRD, *lipid raft domain*), eine geringere Calcium-Mobilisierung und eine reduzierte Expression der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax beobachtet. Auch bei diesen Rituximab-resistenten Klonen konnte durch Proteasominhibition die Rituximab-Resistenz zum Teil wieder aufgehoben werden (Czuczman et al., 2008; Olejniczak et al., 2008). Diese Arbeiten bestätigen den Einfluss der Bcl-2-Proteinfamilie sowie der MAPK- und PI3K-Signalwege bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Rituximab *in vitro*.

Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse, dass primäre und sekundäre Resistenzen gegenüber Rituximab auf vergleichbaren molekularen Mechanismen beruhen. Allerdings müssen zu einem vollständigen Verständnis dieser Mechanismen die intrazellulären Signalwege von Rituximab noch weiter aufgeklärt werden.

4.3 Ausblick

Mit dieser Arbeit über die direkten, intrazellulären Wirkmechanismen von Rituximab sowie der konstitutiven Resistenz gegenüber Rituximab in B-NHL wurden die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie und der PI3K/Akt-Signalweg als potentielle, molekulare Ziele *in vitro* und *in vivo* identifiziert und anhand von primären B-NHL-Proben validiert. Eine Kombinationstherapie von Rituximab mit BH3-Mimetika oder PI3K-Inhibitoren könnte somit die Effizienz der Therapie von B-NHL-Patienten verbessern (Abb. 4.2). Außerdem kann die Expression der anti-apoptotischen Proteine und die Aktivierung des PI3K-Signalweges als prädiktive molekulare Marker verwendet werden, um den Therapieerfolg von B-NHL-Patienten mit Rituximab einzuschätzen. Dies bedarf allerdings einer prospektiven Validierung dieser Ergebnisse.

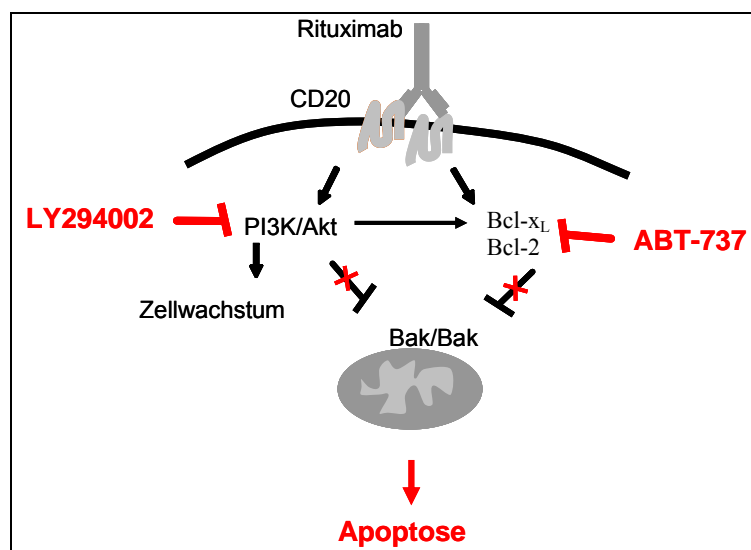


Abbildung 4.2 Sensitivierung Rituximab-resistenter B-NHL gegenüber der Rituximab-induzierten Apoptose durch die Kombination von Rituximab mit dem BH3-Mimetikum ABT-737 oder dem PI3K-Inhibitor LY294002.

In den letzten Jahren fokussierten sich verschiedene Arbeitsgruppen innerhalb präklinischer Untersuchungen auf die Entwicklung neuer Rituximab-Kombinationstherapien zur Sensitivierung resistenter B-NHL. Dabei wurde beobachtet, dass die Kombination von Rituximab mit dem mTOR-Inhibitor Rad001, mit dem Bcl-2-Antisense Oligonukleotid Genasense, mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib oder mit dem Histondeacetylase-

Inhibitor SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) resistente B-NHL *in vitro* und *in vivo* effektiv gegenüber Rituximab sensitiviert (Wanner et al., 2006; Zhao et al., 2007; Lenz et al., 2007; Wang et al., 2008; Zhao et al., 2007; Ramanarayanan et al., 2004). Auch die Kombination von Rituximab mit anderen therapeutischen Antikörpern wird untersucht. Beispiele sind Antikörper gegen den Todesrezeptor TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*)-Rezeptor, Fas (CD95/Apo1), das MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse II-Molekül HLA-DR (*human leukocyte antigen DR*) oder das Zelloberflächenmolekül CD52 (Daniel et al., 2007; Stel et al., 2007; Tobin et al., 2007; Maddipatla et al., 2007; Smolewski et al., 2006). Die klinischen Studien der kommenden Jahre werden zeigen, ob eine oder mehrere dieser Strategien zu einer weiteren Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten für B-NHL-Patienten führen.

Literaturverzeichnis

Akkina,R.K., Walton,R.M., Chen,M.L., Li,Q.X., Planelles,V., Chen,I.S.Y. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34(+) cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *Journal of Virology* 70, 2581-2585.

Alessi,D.R., Andjelkovic,M., Caudwell,B., Cron,P., Morrice,N., Cohen,P., Hemmings,B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo Journal* 15, 6541-6551.

Alessi,D.R., James,S.R., Downes,C.P., Holmes,A.B., Gaffney,P.R.J., Reese,C.B., Cohen,P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Current Biology* 7, 261-269.

Alfredsson,J., Puthalakath,H., Martin,H., Strasser,A., Nilsson,G. (2005). Proapoptotic Bcl-2 family member Bim is involved in the control of mast cell survival and is induced together with Bcl-X-L upon IgE-receptor activation. *Cell Death and Differentiation* 12, 136-144.

Allen,C.D.C., Okada,T., Cyster,J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202.

Anderson,K.E., Coadwell,J., Stephens,L.R., Hawkins,P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Current Biology* 8, 684-691.

Andjelkovic,M., Maira,S.M., Cron,P., Parker,P.J., Hemmings,B.A. (1999). Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and ser473 kinase. *Molecular and Cellular Biology* 19, 5061-5072.

Andrabi,S., Gjoerup,O.V., Kean,J.A., Roberts,T.M., Schaffhausen,B. (2007). Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19011-19016.

Arber,W., Linn,S. (1969). DNA modification and restriction. *Annual Review Biochemistry* 38: 467-500.

Bacchetti,S., Graham,F.L. (1977). Transfer of gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes-simplex viral-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 1590-1594.

Bader,A.G., Kang,S.Y., Zhao,L., Vogt,P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer* 5, 921-929.

Bairey,O., Zimra,Y., Shaklai,M., Okon,E., Rabizadeh,E. (1999). Bcl-2, Bcl-X, Pax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clinical Cancer Research* 5, 2860-2866.

Bannerji,R., Kitada,S., Flinn,I.W., Pearson,M., Young,D., Reed,J.C., Byrd,J.C. (2003). Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic

leukemia: Relationship to in vivo rituximab resistance. *Journal of Clinical Oncology* 21, 1466-1471.

Barnhart,B.C., Alappat,E.C., Peter,M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Seminars in Immunology* 15, 185-193.

Baxter,A.G., Cooke,A. (1993). Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in Nod mice. *Diabetes* 42, 1574-1578.

Berns,K., Horlings,H.M., Hennessy,B.T., Madiredjo,M., Hijmans,E.M., Beelen,K., Linn,S.C., Gonzalez-Angulo,A.M., Stemke-Hale,K., Hauptmann,M., Beijersbergen,R.L., Mills,G.B., de Vijver,M.J.V., Bernards,R. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 395-402.

Bertolini,F., Fusetti,L., Mancuso,P., Gobbi,A., Corsini,C., Ferrucci,P.F., Martinelli,G., Pruneri,G. (2000). Endostatin, an antiangiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 96, 282-287.

Bertrand,R., Solary,E., Oconnor,P., Kohn,K.W., Pommier,Y. (1994). Induction of A Common Pathway of Apoptosis by Staurosporine. *Experimental Cell Research* 211, 314-321.

Bezombes,C., Grazide,S., Garret,C., Fabre,C., Quillet-Mary,A., Muller,S., Jaffrezou,J.P., Laurent,G. (2004). Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* 104, 1166-1173.

Billen,L.P., Kokoski,C.L., Lovell,J.F., Leber,B., Andrews,D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *Plos Biology* 6, 1268-1280.

Binder,M., Otto,F., Mertelsmann,R., Veelken,H., Trepel,M. (2006). The epitope recognized by rituximab. *Blood* 108, 1975-1978.

Birnboim,H.C., Doly,J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.

Bonavida,B. (2007). Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 26, 3629-3636.

Bosma,M., Schuler,W., Bosma,G. (1988). The Scid mouse mutant. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 137, 197-202.

Bouillet,P., Metcalf,D., Huang,D.C.S., Tarlinton,D.M., Kay,T.W.H., Kontgen,F., Adams,J.M., Strasser,A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735-1738.

Bradford,M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brien,G., Trescol-Bierriant,M.C., Bonnefoy-Berard,N. (2007). Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cells to apoptosis. *Oncogene* 26, 5828-5832.

- Brodbeck,D.**, Cron,P., Hemmings,B.A. (1999). A human protein kinase B gamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9133-9136.
- Brunet,A.**, Bonni,A., Zigmond,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Burnette,W.N.** (1981). Western blotting - electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein-A. *Analytical Biochemistry* 112, 195-203.
- Buske,C.**, Hoster,E., Dreyling,M., Eimermacher,H., Wandt,H., Metzner,B., Fuchs,R., Bittenbring,J., Woermann,B., Hohloch,K., Hess,G., Ludwig,W.D., Schimke,J., Schmitz,S., Kneba,M., Reiser,M., Graeven,U., Klapper,W., Unterhalt,M., Hiddemann,W. (2008). The addition of rituximab to front-line therapy with CHOP (R-CHOP) results in a higher response rate and longer time to treatment failure in patients with lymphoplasmacytic lymphoma: results of a randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Leukemia*. 2008 Sep 25. [Epub ahead of print].
- Byrd,J.C.**, Kitada,S., Flinn,I.W., Aron,J.L., Pearson,M., Lucas,N., Reed,J.C. (2002). The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99, 1038-1043.
- Cardone,M.H.**, Roy,N., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., Franke,T.F., Stanbridge,E., Frisch,S., Reed,J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Carracedo,A.**, Pandolfi,P.P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527-5541.
- Certo,M.**, Moore,V.D., Nishino,M., Wei,G., Korsmeyer,S., Armstrong,S.A., Letai,A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351-365.
- Chan,H.T.C.**, Hughes,D., French,R.R., Tutt,A.L., Walshe,C.A., Teeling,J.L., Glennie,M.J., Cragg,M.S. (2003). CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into Triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Research* 63, 5480-5489.
- Chen,L.**, Willis,S.N., Wei,A., Smith,B.J., Fletcher,J.I., Hinds,M.G., Colman,P.M., Day,C.L., Adams,J.M., Huang,D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell* 17, 393-403.
- Chen,S.**, Dai,Y., Harada,H., Dent,P., Grant,S. (2007). Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing bak activation and bax translocation. *Cancer Research* 67, 782-791.
- Cheng,E.H.Y.**, Levine,B., Boise,L.H., Thompson,C.B., Hardwick,J.M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-x(L). *Nature* 379, 554-556.

- Cheson,B.D., Leonard,J.P.** (2008). Drug therapy: Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine* 359, 613-626.
- Chien,A., Edgar,D.B., Trela,J.M.** (1976). Deoxyribonucleic-acid polymerase from extreme thermophile *Thermus-Aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127, 1550-1557.
- Chipuk,J.E., Kuwana,T., Bouchier-Hayes,L., Droin,N.M., Newmeyer,D., Schuler,M., Green,D.R.** (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.
- Chow,K.U., Sommerlad,W.D., Boehrer,S., Schneider,B., Seipelt,G., Rummel,M.J., Hoelzer,D., Mitrou,P.S., Weidmann,E.** (2002). Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica* 87, 33-43.
- Cittera,E., Onofri,C., D'Apolito,M., Cartron,G., Cazzaniga,G., Zelante,L., Paolucci,P., Biondi,A., Introna,M., Golay,J.** (2005). Rituximab induces different but overlapping sets of genes in human B-lymphoma cell lines. *Cancer Immunology Immunotherapy* 54, 273-286.
- Clynes,R.A., Towers,T.L., Presta,L.G., Ravetch,J.V.** (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 6, 443-446.
- Coiffier,B., Lepage,E., Briere,J., Herbrecht,R., Tilly,H., Bouabdallah,R., Morel,P., Van den Neste,E., Salles,G., Gaulard,P., Reyes,F., Gisselbrecht,C.** (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* 346, 235-242.
- Compton,S.J. Jones,C.G.** (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151, 369-374.
- Cory,S., Adams,J.M.** (2002). The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2, 647-656.
- Cory,S., Huang,D.C.S., Adams,J.M.** (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- Cragg,M.S., Morgan,S.M., Chan,H.T.C., Morgan,B.P., Filatov,A.V., Johnson,P.W.M., French,R.R., Glennie,M.J.** (2003). Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101, 1045-1052.
- Cragg,M.S., Glennie,M.J.** (2004). Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103, 2738-2743.
- Cully,M., You,H., Levine,A.J., Mak,T.W.** (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 6, 184-192.
- Czuczman,M.S., Olejniczak,S., Gowda,A., Kotowski,A., Binder,A., Kaur,H., Knight,J., Starostik,P., Deans,J., Hernandez-Ilizaliturri,F.J.** (2008). Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clinical Cancer Research* 14, 1561-1570.

- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., Thibault, G. (2004).** Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: Influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Research* *64*, 4664-4669.
- Daniel, D., Yang, B., Lawrence, D.A., Totpal, K., Balter, I., Lee, W.P., Gogineni, A., Cole, M.J., Yee, S.F., Ross, S., Ashkenazi, A. (2007).** Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts. *Blood* *110*, 4037-4046.
- Daniels, I., Turzanski, J., Haynes, A.P. (2008).** A requirement for calcium in the caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *British Journal of Haematology* *142*, 394-403.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. (1999).** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* *13*, 2905-2927.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H.A., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231-241.
- Deans, J.P., Kalt, L., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Bolen, J.B., Johnson, P. (1995).** Association of 75/80-Kda phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B-cell molecule-CD20 - Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 22632-22638.
- Dekroon, J.F.E.M., Kluin, P.M., Kluinnelemans, H.C., Willemze, R., Falkenburg, J.H.F. (1994).** Homing and antigenic characterization of a human Non-Hodgkins-Lymphoma B-cell line in severe combined immunodeficient (Scid) mice. *Leukemia* *8*, 1385-1391.
- delPeso, L., GonzalezGarcia, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G. (1997).** Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* *278*, 687-689.
- Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M., Letai, A. (2007).** BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* *12*, 171-185.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., Golay, J. (2003).** Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of Immunology* *171*, 1581-1587.
- Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W.F., Thomas, N.S.B., Lammers, J.W.J., Koenderman, L., Coffey, P.J. (2002).** FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *Journal of Cell Biology* *156*, 531-542.
- Eberstadt, M., Huang, B.H., Chen, Z.H., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L.X., Lenardo, M.J., Fesik, S.W. (1998).** NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* *392*, 941-945.
- Ehrlich, P. (1900).** On immunity with special reference to the cell of life. *Proceedings of Research Society London* *66*, 424-428.

- Engvall,E.**, Perlman P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Espana,L.**, Fernandez,Y., Rubio,N., Torregrosa,A., Blanco,J., Sierra,A. (2004). Overexpression of Bcl-x(L) in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment* 87, 33-44.
- Everton,K.L.** (2008). Quantitative proteomic analysis of follicular lymphoma cells in response to rituximab. *Journal Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science*, 2008 Oct 28. [Epub ahead of print].
- Fan,Q.W.**, Specht,K.M., Zhang,C., Goldenberg,D.D., Shokat,K.M., Weiss,W.A. (2003). Combinatorial efficacy achieved through two-point blockade within a signaling pathway - A chemical genetic approach. *Cancer Research* 63, 8930-8938.
- Fesik,S.W.** (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer* 5, 876-885.
- Fischer,L.**, Penack,O., Gentilini,C., Nogai,A., Muessig,A., Thiel,E., Uharek,L. (2006). The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Experimental Hematology* 34, 753-759.
- Gaidano,G.**, Ballerini,P., Gong,J.Z., Inghirami,G., Neri,A., Newcomb,E.W., Magrath,I.T., Knowles,D.M., Dalla-Favera,R. (1991). P53 mutations in human lymphoid malignancies - association with Burkitt-lymphoma and chronic lymphocytic-leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5413-5417.
- Gallo,K.A.**, Johnson,G.L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 663-672.
- Gao,T.Y.**, Furnari,F., Newton,A.C. (2005). PHLPP: A phosphatase that directly dephosphorylates akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular Cell* 18, 13-24.
- Garcia-Echeverria,C.**, Sellers,W.R. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 27, 5511-5526.
- Ghetie,M.A.**, Richardson,J., Tucker,T., Jones,D., Uhr,J.W., Vitetta,E.S. (1990). Disseminated or localized growth of a human B-cell tumor (Daudi) in Scid mice. *International Journal of Cancer* 45, 481-485.
- Ghetie,M.A.**, Tucker,K., Richardson,J., Uhr,J.W., Vitetta,E.S. (1992). The antitumor-activity of an anti-Cd22 immunotoxin in Scid mice with disseminated Daudi lymphoma is enhanced by either an anti-Cd19 antibody or an anti-Cd19 immunotoxin. *Blood* 80, 2315-2320.
- Goff,S.P.**, Berg,P. (1976). Construction of hybrid viruses containing SV40 and gamma phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9, 695-705.
- Gohde,W.**, Dittrich,W. (1971). Impulse fluorometry - new perfusion method for rapid quantitative determination of cell components. *Acta Histochemica* 429-&.

- Golay, J., Zaffaroni, L., Vaccari, T., Lazzari, M., Borleri, G.M., Bernasconi, S., Tedesco, F., Rambaldi, A., Introna, M. (2000).** Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 95, 3900-3908.
- Golay, J., Cittera, E., Di Gaetano, N., Manganini, M., Mosca, M., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Vago, L., Introna, M. (2006).** The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica-the Hematology Journal* 91, 176-183.
- Gottschalk, A.R., Boise, L.H., Thompson, C.B., Quintans, J. (1994).** Identification of Immunosuppressant-Induced Apoptosis in A Murine B-Cell Line and Its Prevention by Bcl-X But Not Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7350-7354.
- Grad, J.M., Zeng, X.R., Boise, L.H. (2000).** Regulation of Bcl-x(L): a little bit of this and a little bit of STAT. *Current Opinion in Oncology* 12, 543-549.
- Graham, F.L., Vandereb, A.J. (1973).** New Technique for Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 Dna. *Virology* 52, 456-467.
- Green, D.R., Kroemer, G. (2004).** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Gronbaek, K., Straten, P.T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M.K., Hansen, N.E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., Guldberg, P. (1998).** Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: Association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92, 3018-3024.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., Sabatini, D.M. (2006).** Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC alpha but not S6K1. *Developmental Cell* 11, 859-871.
- Haidar, J.H., Shamseddine, A., Salem, Z., Mrad, Y.A., Nasr, M.R., Zaatari, G., Bazarbachi, A. (2003).** Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy. *European Journal of Haematology* 70, 330-332.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., Bloomfield, C.D. (1999).** World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology* 17, 3835-3849.
- Hatjiharissi, E., Xu, L.A., Santos, D.D., Hunter, Z.R., Ciccarelli, B.T., Verselis, S., Modica, M., Cao, Y., Manning, R.J., Leleu, X., Dimmock, E.A., Kortsaris, A., Mitsiades, C., Anderson, K.C., Fox, E.A., Treon, S.P. (2007).** Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc gamma RIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 110, 2561-2564.

- Haystead**, Sim,A.T.R., Carling,D., Honnor,R.C., Tsukitani,Y., Cohen,P., Hardie,D.G. (1989). Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein-phosphorylation and metabolism. *Nature* 337, 78-81.
- Helenius**,A., Simons,K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 415, 29-79.
- Hengartner**,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hess**,G., Flohr,T., Kolbe,K., Bonn,S., Schuler,M., Derigs,H.G., Huber,C. (2006). Effect of rituximab on the long-term outcome after high-dose therapy for relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Hematology* 85, 769-779.
- Hernandez-Ilizaliturri**,F.J., Jupudy,V., Ostberg,J., Oflazoglu,E., Huberman,A., Repasky,E., Czuczman,M.S. (2003). Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clinical Cancer Research* 9, 5866-5873.
- Hiddemann**,W., Kneba,M., Dreyling,M., Schmitz,N., Lengfelder,E., Schmits,R., Reiser,M., Metzner,B., Harder,H., Hegewisch-Becker,S., Fischer,T., Kropff,M., Reis,H.E., Freund,M., Wormann,B., Fuchs,R., Planker,M., Schimke,J., Eimermacher,H., Trumper,L., Aldaoud,A., Parwaresch,R., Unterhalt,M. (2005). Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106, 3725-3732.
- Higuchi**,R., Dollinger,G., Walsh,P.S., Griffith,R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA-Sequences. *Bio-Technology* 10, 413-417.
- Hjerten**,S. (1971). Some new methods for preparation of agarose. *Journal of Chromatography* 61, 73-83.
- Hömig-Hölzel**,C., Hojer,C., Rastelli,J., Casola,S., Strobl,L.J., Muller,W., Quintanilla-Martinez,L., Gewies,A., Ruland,J., Rajewsky,K., Zimmer-Strobl,U. (2008). Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappa B pathway and promotes lymphomagenesis. *Journal of Experimental Medicine* 205, 1317-1329.
- Hong**,C., Leeder,S., Cook,V.A., Patterson,B., Dosch,M., Minden,M.D., Messner,H.A. (1992). Growth of Human Lymphoma-Cells in Scid Mice. *Leukemia & Lymphoma* 8, 129-136.
- Hsueh**,R.C., Scheuermann,R.H. (2000). Tyrosine kinase activation in the decision between growth, differentiation, and death responses initiated from the B cell antigen receptor. *Advances in Immunology* 75, 283-316.
- Hu**,L.M., Zaloudek,C., Mills,G.B., Gray,J., Jaffe,R.B. (2000). In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clinical Cancer Research* 6, 880-886.
- Hussain**,S.R.A., Cheney,C.M., Johnson,A.J., Lin,T.S., Grever,M.R., Caligiuri,M.A., Lucas,D.M., Byrd,J.C. (2007). Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic

lymphoid malignancies: Down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clinical Cancer Research* 13, 2144-2150.

Ichijo,H., Nishida,E., Irie,K., tenDijke,P., Saitoh,M., Moriguchi,T., Takagi,M., Matsumoto,K., Miyazono,K., Gotoh,Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.

Igney,F.H., Krammer,P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Review Cancer* 2, 277-288.

Ikenoue,T., Inoki,K., Yang,Q., Zhou,X., Guan,K.L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *Embo Journal* 27, 1919-1931.

Imai,K., Takaoka,A. (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 714-727.

Ishibashi,K., Suzuki,M., Sasaki,S., Imai,M. (2001). Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene* 264, 87-93.

Itoh,T., Shiota,M., Takanashi,M., Hojo,I., Satoh,H., Matsuzawa,A., Moriyama,T., Watanabe,T., Hirai,K., Mori,S. (1993). Engraftment of Human Non-Hodgkin Lymphomas in Mice with Severe Combined Immunodeficiency. *Cancer* 72, 2686-2694.

Jaffe,E.S., Harris,N.L., Stein,H. (2001). Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Kleihues P, Sobin L (Eds) World Health Organization classification of tumours. IARC, Lyon.

Jais,J.P., Haioun,C., Molina,T.J., Rickman,D.S., de Reynies,A., Berger,F., Gisselbrecht,C., Brière,J., Reyes,F., Gaulard,P., Feugier,P., LabouyrieE., Tilly,H., Bastard,C., Coiffier,B., Salles,G., Leroy,K. (2008). The expression of 16 genes related to the cell of origin and immune response predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP and rituximab. *Leukemia* 10, 7-15.

James,S.R., Downes,C.P., Gigg,R., Grove,S.J.A., Holmes,A.B., Alessi,D.R. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochemical Journal* 315, 709-713.

Janas,E., Priest,R., Wilde,J.I., White,J.H., Malhotra,R. (2005). Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clinical and Experimental Immunology* 139, 439-446.

Jazirehi,A.R., Gan,X.H., De Vos,S., Emmanouilides,C., Bonavida,B. (2003). Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 2, 1183-1193.

Jazirehi,A.R., Huerta-Yepez,S., Cheng,G.H., Bonavida,B. (2004a). Rituximab-mediated inhibition of the constitutive NIK/IKK/I kappa B/NF-kappa B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) B-cell lines: Role in chemo-sensitization. *Blood* 104, 86A.

- Jazirehi, A.R., Vega, M.I., Chatterjee, D., Goodglick, L., Bonavida, B. (2004b).** Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-(xL) down-regulation, and chemosensitization of non-hodgkin's lymphoma B cells by rituximab. *Cancer Research* 64, 7117-7126.
- Jazirehi, A.R., Huerta-Yepez, S., Cheng, G.H., Bonavida, B. (2005).** Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor-kappa B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: Role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Research* 65, 264-276.
- Jazirehi, A.R., Vega, M.I., Bonavida, B. (2007).** Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Research* 67, 1270-1281.
- Jung, D., Alt, F.W. (2004).** Unraveling V(D)J recombination: Insights into gene regulation. *Cell* 116, 299-311.
- Kaplan, E.L., Meier, P. (1958).** Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal American States Association* 53, 457-481.
- Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., Milanov, Z.V., Morrison, M.J., Pallares, G., Patel, H.K., Pritchard, S., Wodicka, L.M., Zarrinkar, P.P. (2008).** A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* 26, 127-132.
- Kaufmann, S.H.E. (2008).** Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology* 9, 705-712.
- Kennedy, G.A., Tey, S.K., Cobcroft, R., Marlton, P., Cull, G., Grimmett, K., Thomson, D., Gill, D. (2002).** Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *British Journal of Haematology* 119, 412-416.
- Kim, D.H., Du Jung, H., Kim, J.G., Lee, J.J., Yang, D.H., Park, Y.H., Do, Y.R., Shin, H.J., Kim, M.K., Hyun, M.S., Sohn, S.K. (2006).** FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 108, 2720-2725.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.D., Cheng, E.H.Y. (2006).** Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology* 8, 1348-1U19.
- Kim, S.W., Oleksyn, D.W., Rossi, R.M., Jordan, C.T., Sanz, I., Chen, L., Zhao, J. (2008).** Protein kinase C-associated kinase is required for NF-kappaB signaling and survival in diffuse large B-cell lymphoma cells. *Blood* 111, 1644-1653.
- Klein, U., Dalla-Favera, R. (2008).** Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* 8, 22-33.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975).** Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 256, 495-497.

- Kohl**,T.M., Hellinger,C., Ahmed,F., Buske,C., Hiddemann,W., Bohlander,S.K., Spiekermann,K. (2007). BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia* 21, 1763-1772.
- Konopleva**,M., Contractor,R., Tsao,T., Samudio,I., Ruvalo,P.P., Kitada,S., Deng,X.M., Zhai,D.Y., Shi,Y.X., Sneed,T., Verhaegen,M., Soengas,M., Ruvolo,V.R., McQueen,T., Schober,W.D., Watt,J.C., Jiffar,T., Ling,X.Y., Marini,F.C., Harris,D., Dietrich,M., Estrov,Z., McCubrey,J., May,W.S., Reed,J.C., Andreeff,M. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375-388.
- Krutzik**,P.O., Nolan,G.P. (2006). Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. *Nature Methods* 3, 361-368.
- Küppers**,R., Klein,U., Hansmann,M.L., Rajewsky,K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *New England Journal of Medicine* 341, 1520-1529.
- Küppers**,R., Dalla-Favera,R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-5594.
- Küppers**,R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* 5, 251-262.
- Kumar**,S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 14, 32-43
- Kurosaki**,T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nature Reviews Immunology* 2, 354-363.
- Kuwana**,T., Bouchier-Hayes,L., Chipuk,J.E., Bonzon,C., Sullivan,B.A., Green,D.R., Newmeyer,D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* 17, 525-535.
- Laemmli**,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-683.
- Lam**,L.T., Wright,G., Davis,R.E., Lenz,G., Farinha,P., Dang,L., Chan,J.W., Rosenwald,A., Gascoyne,R.D., Staudt,L.M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-kappa B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 3701-3713.
- Lamkanfi**,M., Festjens,N., Declercq,W., Vanden Berghe,T., Vandenabeele,P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation* 14, 44-55.
- Le Good**,J.A., Ziegler,W.H., Parekh,D.B., Alessi,D.R., Cohen,P., Parker,P.J. (1998). Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045.

- Lenz,G., Nagel,I., Siebert,R., Roschke,A.V., Sanger,W., Wright,G.W., Dave,S.S., Tan,B., Zhao,H., Rosenwald,A., Muller-Hermelink,H.K., Gascoyne,R.D., Campo,E., Jaffe,E.S., Smeland,E.B., Fisher,R.I., Kuehl,W.M., Chan,W.C., Staudt,L.M.** (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine* 204, 633-643.
- Lenz,G., Wright,G.W., Emre,N.C.T., Kohlhammer,H., Dave,S.S., Davis,R.E., Carty,S., Lam,L.T., Shaffer,A.L., Xiao,W.M., Powell,J., Rosenwald,A., Ott,G., Muller-Hermelink,H.K., Gascoyne,R.D., Connors,J.M., Campo,E., Jaffe,E.S., Delabie,J., Smeland,E.B., Rimsza,L.M., Fisher,R.I., Weisenburger,D.D., Chan,W.C., Staudt,L.M.** (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13520-13525.
- Leseux,L., Hamdi,S.M., al Saati,T., Capilla,F., Recher,C., Laurent,G., Bezombes,C.** (2006). Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood* 108, 4156-4162.
- Leseux,L., Laurent,G., Laurent,C., Rigo,M., Blanc,A., Olive,D., Bezombes,C.** (2008). PKC zeta-mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood* 111, 285-291.
- Le Pecq,J.B., Paoletti,C.** (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry* 17, 100-107.
- Li,H.L., Yuan,J.Y.** (1998). Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the FAS pathway of apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 9, 256A.
- Li,J., Yen,C., Liaw,D., Podsypanina,K., Bose,S., Wang,S.I., Puc,J., Miliaresis,C., Rodgers,L., McCombie,R., Bigner,S.H., Giovanella,B.C., Ittmann,M., Tycko,B., Hibshoosh,H., Wigler,M.H., Parsons,R.** (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Macor,P., Tripodo,C., Zorzet,S., Piovan,E., Bossi,F., Marzari,R., Amadori,A., Tedesco,F.** (2007). In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Research* 67, 10556-10563.
- Maddipatla,S., Hernandez-Ilizaliturri,F.J., Knight,J., Czuczman,M.S.** (2007). Augmented antitumor activity against B-Cell lymphoma by a combination of monoclonal antibodies targeting TRAIL-R1 and CD20. *Clinical Cancer Research* 13, 4556-4564.
- Maloney,D.G., GrilloLopez,A.J., White,C.A., Bodkin,D., Schilder,R.J., Neidhart,J.A., Janakiraman,N., Foon,K.A., Liles,T.M., Dallaire,B.K., Wey,K., Royston,I., Davis,T., Levy,R.** (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 2188-2195.
- Manches,O., Lui,G., Chaperot,L., Gressin,R., Molens,J.P., Jacob,M.C., Sotto,J.J., Leroux,D., Bensa,J.C., Plumas,J.** (2003). In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949-954.
- Mankai,A., Bordon,A., Renaudineau,Y., Martins-Carvalho,C., Takahashi,S., Ghedira,I., Berthou,C., Youinou,P.** (2008). Purine-rich box-1-mediated reduced expression of CD20

alters rituximab-induced lysis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Cancer Research* 68, 7512-7519.

Mann,R., Mulligan,R.C., Baltimore,D. (1983). Construction of A Retrovirus Packaging Mutant and Its Use to Produce Helper-Free Defective Retrovirus. *Cell* 33, 153-159.

Mantel,N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports* 50, 163–70.

Martelli,A.M., Nyakern,M., Tabellini,G., Bortul,R., Tazzari,P.L., Evangelisti,C., Cocco,L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 911-928.

Martinou,J.C., Green,D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 63-67.

Maurer,U., Charvet,C., Wagman,A.S., Dejardin,E., Green,D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell* 21, 749-760.

Maxam,A.M., Gilbert,W. (1977). New Method for Sequencing Dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 560-564.

Michl M., Reiche D. (2005). Hämatologie: Basics. Urban & Fischer, Elsevier.

Mills,J.R., Hippo,Y., Robert,F., Chen,S.M.H., Malina,A., Lin,C.J., Trojahn,U., Wendel,H.G., Charest,A., Bronson,R.T., Kogan,S.C., Nadon,R., Housman,D.E., Lowe,S.W., Pelletier,J. (2008). mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10853-10858.

Müller,T., Uherek,C., Maki,G., Chow,K.U., Schimpf,A., Klingemann,H.G., Tonn,T., Wels,W.S. (2008). Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunology Immunotherapy* 57, 411-423.

Müschen,M., Re,D., Jungnickel,B., Diehl,V., Rajewsky,K., Küppers,R. (2000). Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1833-1839.

Mullis,K.B., Faloona,F.A. (1987). Specific Synthesis of Dna Invitro Via A Polymerase-Catalyzed Chain-Reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.

Nadler,L.M., Ritz,J., Hardy,R., Pesando,J.M., Schlossman,S.F., Stashenko,P. (1981). A Unique Cell-Surface Antigen Identifying Lymphoid Malignancies of B-Cell Origin. *Journal of Clinical Investigation* 67, 134-140.

Nicoletti,I., Migliorati,G., Pagliacci,M.C., Grignani,F., Riccardi,C. (1991). A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow-Cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139, 271-279.

Nimmerjahn,F. Ravetch,J.V. (2008). Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8, 34-47.

- Nolan**,T., Hands,R.E., Bustin,S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1, 1559-1582.
- O'Keefe**,T.L., Williams,G.T., Davies,S.L., Neuberger,M.S. (1998). Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics* 48, 125-132.
- Olejniczak**,S.H., Hernandez-Ilizaliturri,F.J., Clements,J.L., Czuczman,M.S. (2008). Acquired resistance to Rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clinical Cancer Research* 14, 1550-1560.
- Olopade**,O.I., Adeyanju,M.O., Safa,A.R., Hagos,F., Mick,R., Thompson,C.B., Recant,W.M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer Journal from Scientific American* 3, 230-237.
- Oltsersdorf**,T., Elmore,S.W., Shoemaker,A.R., Armstrong,R.C., Augeri,D.J., Belli,B.A., Bruncko,M., Deckwerth,T.L., Dinges,J., Hajduk,P.J., Joseph,M.K., Kitada,S., Korsmeyer,S.J., Kunzer,A.R., Letai,A., Li,C., Mitten,M.J., Nettesheim,D.G., Ng,S., Nimmer,P.M., O'Connor,J.M., Oleksijew,A., Petros,A.M., Reed,J.C., Shen,W., Tahir,S.K., Thompson,C.B., Tomaselli,K.J., Wang,B.L., Wendt,M.D., Zhang,H.C., Fesik,S.W., Rosenberg,S.H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677-681.
- Ow**,Y.L.P., Green,D.R., Hao,Z., Mak,T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 532-542.
- Pasqualucci**,L., Migliazza,A., Fracchiolla,N., William,C., Neri,A., Baldini,L., Chaganti,R.S.K., Klein,U., Küppers,R., Rajewsky,K., Dalla-Favera,R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11816-11821.
- Pasqualucci**,L., Compagno,M., Houldsworth,J., Monti,S., Grunn,A., Nandula,S.V., Aster,J.C., Murty,V.V., Shipp,M.A., Dalla-Favera,R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine* 203, 311-317.
- Pedersen**,I.M., Buhl,A.M., Klausen,P., Geisler,C.H., Jurlander,J. (2002). The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 99, 1314-1319.
- Pelengaris**,S., Khan,M., Evan,G. (2002). c-MYC: More than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer* 2, 764-776.
- Peter**,M.E., Krammer,P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation* 10, 26-35.
- Petrie**,R.J., Deans,J.P. (2002). Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *Journal of Immunology* 169, 2886-2891.
- Peto**,R., Peto, J. (1972). Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)* 135 (2): 185-207.

- Pfreundschuh,M.**, Trumper,L., Osterborg,A., Pettengell,R., Trneny,M., Imrie,K., Ma,D., Gill,D., Walewski,J., Zinzani,P.L., Stahel,R., Kvaloy,S., Shpilberg,O., Jaeger,U., Hansen,M., Lehtinen,T., Lopez-Guillermo,A., Corrado,C., Scheliga,A., Milpied,N., Mendila,M., Rashford,M., Kuhnt,E., Loeffler,M. (2006). CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncology* 7, 379-391.
- Pierce,S.K.** (2002). Lipid rafts and B-cell activation. *Nature Reviews Immunology* 2, 96-105.
- Pingoud,A.**, Jeltsch,A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research* 29, 3705-3727.
- Polyak,M.J.**, Deans,J.P. (2002). Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 99, 3256-3262.
- Polyak,M.J.**, Li,H.D., Shariat,N., Deans,J.P. (2008). CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor - Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 283, 18545-18552.
- Puthalakath,H.**, Strasser,A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and posttranslational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death and Differentiation* 9, 505-512.
- Rajewsky,K.** (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Ramanarayanan,J.**, Hernandez-Ilizaliturri,F.J., Chanan-Khan,A., Czuczman,M.S. (2004). Pro-apoptotic therapy with the oligonucleotide Genasense (TM) (oblimersen sodium) targeting Bcl-2 protein expression enhances the biological anti-tumour activity of rituximab. *British Journal of Haematology* 127, 519-530.
- Raymond,S.**, Weintraub,L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130, 711.
- Remmele,W.**, Stegner,H.E. (1987). A proposal for the standardization of the immunoreactive score (Irs) for the immunohistochemical demonstration of estrogen-receptors (Er-Ica) in breast-cancer. *Pathologie* 8, 138-140.
- Renart,J.**, Reiser,J., Stark,G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera - Method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3116-3120.
- Renne,C.**, Willenbrock,K., Martin-Subero,J.I., Hinsch,N., Doring,C., Tiacci,E., Klapper,W., Möller,P., Küppers,R., Hansmann,M.L., Siebert,R., Bräuninger,A. (2007). High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 21, 780-787.

- Riedl**,S.J., Salvesen,G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 405-413.
- Rudelius**,M., Pittaluga,S., Nishizuka,S., Pham,T.H.T., Fend,F., Jaffe,E.S., Quintanilla-Martinez,L., Raffeld,M. (2006). Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 108, 1668-1676.
- Sahai**,E., Marshall,C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2, 133.
- Saiki**,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saiki**,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., Arnheim,N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sakai**,A., Thieblemont,C., Wellmann,A., Jaffe,E.S., Raffeld,M. (1998). PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 92, 3410-3415.
- Sambrook**,J., Russell,D.W. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press.
- Sanger**,F., Coulson,A.R. (1975). Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA-Polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94, 441-445.
- Sarbassov**,D.D., Guertin,D.A., Ali,S.M., Sabatini,D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sato**,S., Fujita,N., Tsuruo,T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10832-10837.
- Scharenberg**,A.M., Humphries,L.A., Rawlings,D.J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nature Reviews Immunology* 7, 778-789.
- Schmidtolf**,I.G.H., Negrin,R.S., Kiem,H.P., Blume,K.G., Weissman,I.L. (1991). Use of a scid mouse human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer-cells with potent antitumor cell-activity. *Journal of Experimental Medicine* 174, 139-149.
- Sebolt-Leopold**,J.S., Herrera,R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews Cancer* 4, 937-947.
- Semac**,I., Palomba,C., Kulangara,K., Klages,N., van Echten-Deckert,G., Borisch,B., Hoessli,D.C. (2003). Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Research* 63, 534-540.
- Semba**,S., Itoh,N., Ito,M., Harada,M., Yamakawa,M. (2002). The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clinical Cancer Research* 8, 1957-1963.

- Shapiro,A.L.,** Viñuela,E., Maizel,J.V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemistry Biophysics Research Communication* 28 (5), 815-820.
- Shimizu,S.,** Eguchi,Y., Kosaka,H., Kamiike,W., Matsuda,H., and Tsujimoto,Y. (1995). Prevention of Hypoxia-Induced Cell-Death by Bcl-2 and Bcl-Xl. *Nature* 374, 811-813.
- Shiota,C.,** Woo,J.T., Lindner,J., Shelton,K.D., Magnuson,M.A. (2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Developmental Cell* 11, 583-589.
- Shultz,L.D.,** Schweitzer,P.A., Christianson,S.W., Gott,B., Schweitzer,I.B., Tennent,B., Mckenna,S., Mobraaten,L., Rajan,T.V., Greiner,D.L., Leiter,E.H. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunological function in Nod/Ltsz-Scid mice. *Journal of Immunology* 154, 180-191.
- Simonian,P.L.,** Grillo,D.A.M., Nunez,G. (1997). Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 90, 1208-1216.
- Smolewski,P.,** Duechler,M., Linke,A., Cebula,B., Grzybowska-Izydorczyk,O., Shehata,M., Robak,T. (2006). Additive cytotoxic effect of bortezomib in combination with anti-CD20 or anti-CD52 monoclonal antibodies on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia Research* 30, 1521-1529.
- Soneoka,Y.,** Cannon,P.M., Ramsdale,E.E., Griffiths,J.C., Romano,G., Kingsman,S.M., Kingsman,A.J. (1995). A transient 3-plasmid expression system for the production of high-titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research* 23, 628-633.
- Spierings,D.,** McStay,G., Saleh,M., Bender,C., Chipuk,J., Maurer,U., Green,D.R. (2005). Connected to death: The (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 310, 66-67.
- Stanglmaier,M.,** Reis,S., Hallek,M. (2004). Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. *Annals of Hematology* 83, 634-645.
- Stashenko,P.,** Nadler,L.M., Hardy,R., Schlossman,S.F. (1980). Characterization of a human lymphocyte-B-specific antigen. *Journal of Immunology* 125, 1678-1685.
- Steck,P.A.,** Pershouse,M.A., Jasser,S.A., Yung,W.K.A., Lin,H., Ligon,A.H., Langford,L.A., Baumgard,M.L., Hattier,T., Davis,T., Frye,C., Hu,R., Swedlund,B., Teng,D.H.F., Tavtigian,S.V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genetics* 15, 356-362.
- Stel,A.J.,** ten Cate,B., Jacobs,S., Kok,J.W., Spierings,D.C.J., Dondorff,M., Helfrich,W., Kluin-Nelemans,H.C., De Leij,L.F.A.H., Withoff,S., Kroesen,B.J. (2007). Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to Fas-induced apoptosis. *Journal of Immunology* 178, 2287-2295.

- Stephens, L.,** Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T. (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710-714.
- Strasser, A.,** Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D.C.S., O'Connor, L., O'Reilly, L., Cullen, L., Cory, S., Adams, J.M. (2000). The role of Bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family, in cell-death control. *Neuroimmunomodulation* 9/17, 541-548.
- Strasser, A.** (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 5, 189-200.
- Strebhardt, K.,** Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* 8, 473-480.
- Suzuki, E.,** Umezawa, K., Bonavida, B. (2007). Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 26, 6184-6193.
- Takahashi, H.,** Feuerhake, F., Monti, S., Kutok, J.L., Aster, J.C., Shipp, M.A. (2006). Lack of IKBA coding region mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma and the host response subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 107, 844-845.
- Tang, Q.,** Adams, J.Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C.A., Salomon, B.L., Bluestone, J.A. (2008). Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28, 687-697.
- Tedder, T.F.,** Engel, P. (1994). CD20 - a regulator of cell-cycle progression of B-Lymphocytes. *Immunology Today* 15, 450-454.
- Tedder, T.F.,** Klejman, G., Schlossman, S.F., Saito, H. (1989). Structure of the gene encoding the human lymphocyte-B differentiation antigen CD20 (B1). *Journal of Immunology* 142, 2560-2568.
- Temin, H.M.** (1988). Citation classic - RNA-Directed DNA-synthesis and RNA tumor-viruses. *Current Contents/Life Sciences* 19.
- Tobin, E.,** Denardo, G., Zhang, N., Epstein, A.L., Liu, C., DeNardo, S. (2007). Combination immunotherapy with anti-CD20 and anti-HLA-DR monoclonal antibodies induces synergistic anti-lymphoma effects in human lymphoma cell lines. *Leukemia & Lymphoma* 48, 944-956.
- Tomita, A.,** Hiraga, J., Kiyoi, H., Ninomiya, M., Sugimoto, T., Ito, M., Kinoshita, T., Naoe, T. (2007). Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-Cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *International Journal of Hematology* 86, 49-57.
- Tournier, C.,** Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.

- Towbin,H.**, Staehelin,T., Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Townsend,K.J.**, Trusty,J.L., Traupman,M.A., Eastman,A., Craig,R.W. (1998). Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C. *Oncogene* 17, 1223-1234.
- Trotman,L.C.**, Alimonti,A., Scaglioni,P.P., Koutcher,J.A., Cordon-Cardo,C., Pandolfi,P.P. (2006). Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* 441, 523-527.
- Tsuruta,F.**, Masuyama,N., Gotoh,Y. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14040-14047.
- Turzanski,J.**, Daniels,I., Haynes,A.P. (2008). Internalisation of uncross-linked rituximab is not essential for the induction of caspase-independent killing in Burkitt lymphoma cell lines. *Leukemia & Lymphoma* 49, 1578-1591.
- Uddin,S.**, Hussain,A.R., Siraj,A.K., Manogaran,P.S., Al-Jomah,N.A., Moorji,A., Atizado,V., Al-Dayel,F., Belgaumi,A., El-Solh,H., Ezzat,A., Bavi,P., Al-Kuraya,K.S. (2006). Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108, 4178-4186.
- Unruh,T.L.**, Li,H.D., Mutch,C.M., Shariat,N., Grigoriou,L., Sanyal,R., Brown,C.B., Deans,J.P. (2005). Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology* 116, 223-232.
- van Delft,M.F.**, Wei,A.H., Mason,K.D., Vandenberg,C.J., Chen,L., Czabotar,P.E., Willis,S.N., Scott,C.L., Day,C.L., Cory,S., Adams,J.M., Roberts,A.W., Huang,D.C.S. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389-399.
- van der Kolk,L.E.**, Evers,L.M., Omene,C., Lens,S.M.A., Lederman,S., van Lier,R.A.W., van Oers,M.H.J., Eldering,E. (2002). CD20-induced B cell death can bypass mitochondria and caspase activation. *Leukemia* 16, 1735-1744.
- van Meerten,T.**, van Rijn,R.S., Hol,S., Hagenbeek,A., Ebeling,S.B. (2006). Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clinical Cancer Research* 12, 4027-4035.
- van Weemen,B.K.** (2005). The rise of EIA/ELISA. *Clinical Chemistry* 51, 2226.
- varo-Naranjo,T.**, Jaen-Martinez,J., Guma-Padro,J., Bosch-Princep,R., Salvado-Usach,M.T. (2003). CD20-negative DLBCL transformation after rituximab treatment in follicular lymphoma: a new case report and review of the literature. *Annals of Hematology* 82, 585-588.
- Vega,M.I.**, Huerta,S., Garban,H., Jazirehi,A., Alas,S., Emmanouilides,C., Bonavida,B. (2002). Involvement of the p38MAPK pathway in the inhibition of IL-10 synthesis and

secretion by Rituximab in 2F7 NHL cells: Role in inhibition of Bcl-2 expression and sensitization to chemotherapeutic drugs. *Blood* 100, 572A-573A.

Vega, M.I., Huerta-Yepaz, S., Garban, H., Jazirehi, A., Emmanouilides, C., Bonavida, B. (2004). Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 BNHL and decreases IL-10 transcription: Pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene* 23, 3530-3540.

Vega, M.I., Jazirehi, A.R., Huerta-Yepaz, S., Bonavida, B. (2005). Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-x(L) expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: Role of YY1 and Bcl-x(L) in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *Journal of Immunology* 175, 2174-2183.

Vega, M.I., Huerta-Yepaz, S., Martinez-Paniagua, M.A., Bonilla, C.G., Bonavida, B. (2006). Rituximab-mediated inhibition of the p38 MAPK and NF-kappa B survival pathways in vitro and validation in nude mice bearing the Raji B-NHL tumor. *Blood* 108, 672A.

Vivanco, I., Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2, 489-501.

Walker, K.S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., Alessi, D.R. (1998). Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochemical Journal* 331, 299-308.

Walshe, C.A., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H.T., Johnson, P.W., Packham, G.K., Glennie, M.J., Cragg, M.S. (2008). Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B cell antigen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* 283, 16971-16984.

Wang, M., Han, X.H., Zhang, L., Yang, J., Qian, J.F., Shi, Y.K., Kwak, L.W., Romaguera, J., Yi, Q. (2008). Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia* 22, 179-185.

Wang, S.Y., Racila, E., Taylor, R.P., Weiner, G.J. (2008). NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* 111, 1456-1463.

Wanner, K., Hipp, S., Oelsner, M., Ringshausen, I., Bogner, C., Peschel, C., Decker, T. (2006). Mammalian target of rapamycin inhibition induces cell cycle arrest in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells and sensitises DLBCL cells to rituximab. *British Journal of Haematology* 134, 475-484.

Weber, K., Osborn M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal Biological Chemistry* 244, 4406-4412.

Weide, R., Hess, G., Koppler, H., Heymanns, J., Thomalla, J., Aldaoud, A., Losem, C., Schmitz, S., Haak, U., Huber, C., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2007). High anti-lymphoma activity of bendamustine/mitoxantrone/rituximab in rituximab pretreated relapsed or refractory indolent lymphomas and mantle cell lymphomas. A multicenter phase II study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Leukemia & Lymphoma* 48, 1299-1306.

Wesarg,E., Hoffarth,S., Wiewrodt,R., Kroell,M., Biesterfeld,S., Huber,C., Schuler,M. (2007). Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 121, 2387-2394.

Winiarska,M., Bil,J., Wilczek,E., Wilczynski,G.M., Lekka,M., Engelberts,P.J., Mackus,W.J.M., Gorska,E., Bojarski,L., Stoklosa,T., Nowis,D., Kurzaj,Z., Makowski,M., Glodkowska,E., Issat,T., Mrowka,P., Lasek,W., Broska-Iwanicka,A., Basak,G.W., Wasik,M., Warzocha,K., Sinski,M., Gaciong,Z., Jakobisiak,M., Parren,P.W.H.I., Golab,J. (2008). Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *Plos Medicine* 5, 502-517.

Wobser,M., Voigt,H., Eggert,A.O., Houben,R., Kauczok,C.S., Brocker,E.B., Becker,J.C. (2007). Bcl-2 expression in rituximab refractory cutaneous B-cell lymphoma. *British Journal of Cancer* 96, 1540-1543.

Wojciechowski,W., Li,H.F., Marshall,S., Dell'Agnola,C., Espinoza-Delgado,I. (2005). Enhanced expression of CD20 in human tumor B cells is controlled through ERK-dependent mechanisms. *Journal of Immunology* 174, 7859-7868.

Xia,Z.G., Dickens,M., Raingeaud,J., Davis,R.J., Greenberg,M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Yang,Q., Inoki,K., Ikenoue,T., Guan,K.L. (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes & Development* 20, 2820-2832.

Youle,R.J., Strasser,A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 47-59.

Yuan,T.L., Cantley,L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.

Zhao,W.L., Wang,L., Liu,Y.H., Yan,J.S., Leboeuf,C., Liu,Y.Y., Wu,W.L., Janin,A., Chen,Z., Chen,S.J. (2007). Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. *Experimental Hematology* 35, 1801-1811.

Zhou,X., Hu,W., Qin,X. (2008). The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist*. 13, 954-966.

Zhuang,J., Brady,H.J.M. (2006). Emerging role of Mcl-1 in actively counteracting BH3-only proteins in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 13, 1263-1267.

Zipper,H., Brunner,H., Bernhagen,J., Vitzthum,F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32.

zum Büschenfelde,C.M., Fetterstacke,Y., Gotze,K.S., Scholze,K., Peschel,C. (2008). GM1 expression of non-Hodgkins lymphoma determines susceptibility to rituximab treatment. *Cancer Research* 68, 5414-5422.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei der AG Molekulare Onkologie, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen für die Unterstützung während der letzten 3 Jahre bedanken

Lebenslauf

Claudia Stolz
Labor für Molekular Onkologie
Innere Klinik (Tumorforschung)
Westdeutsches Tumorzentrum
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstr. 55
45122 Essen

E-mail: claudia.stolz@uk-essen.de
Tel: +49-201-723-1631
Fax: +49-201-723-5616
www.uni-due.de/tumorforschung/



Persönliche Daten

Geburtsdatum	24.07.1980
Geburtsort	Grimma

Akademische Qualifikation

11/2005 – 02/2009	Doktorarbeit, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen (seit 03/2008) und III. Medizinische Klinik, Universität Mainz (11/2005 – 02/2008) (Prof. M. Schuler)
11/2005 – 03/2008	Graduiertenkolleg ‚Antigen-spezifische Immuntherapie‘ (GK 1042 DFG) Universität Mainz (Prof. M. Neurath)
10/2004 – 05/2006	Postgradualstudium Toxikologie, Universität Leipzig (Prof. J. Hengstler)
10/1999 – 04/2005	Studium Diplom-Biologie (Spezialisierung auf Molekulare Medizin, Biochemie, Genetik, Immunologie, Physiologie und Mikrobiologie), Universität Leipzig

Schulische Ausbildung

08/1994 - 07/1997	Friedrich-Ratzel-Gymnasium, Leipzig
08/1997 - 06/1999	Rudolf-Hildebrand-Gymnasium, Markkleeberg

Wissenschaftliche Arbeiten

- 04/2009 - Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Post-Doktorand), Stem Cell Center, Universität Lund, Schweden (PhD E. Sitnicka)
- 03/2008 – 03/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand), Innere Klinik / Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen (Prof. M. Schuler)
- 11/2005 – 02/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand), III. Medizinische Klinik, Universität Mainz (Prof. M. Schuler)
Doktorarbeit: *‘Identifikation und Modulation von Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen’*
- 04/2005 – 10/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Diplom-Biologe), Cancer Center Karolinska, Department Pathology-Oncology, Karolinska-Institute Stockholm, Sweden (Prof. A. Östman)
Toxikologie-Abschlussarbeit: *‘Identification of novel cancer drug targets in cancer-associated fibroblasts’*
- 04/2004 – 03/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Biologie-Student), Umweltforschungszentrum Leipzig – Halle GmbH, Department Umweltmikrobiologie, Universität Leipzig (Prof. H. Harms)
Diplomarbeit: *‘Polyhydroxybutyrat (PHB)-Biosynthese in rekombinanten Hefen’*
- 05/2003 – 04/2004 Mitarbeiter in der Routinediagnostik (Biologie-Student), Zytogenetisches Labor, Institut für Humangenetik, Universität Leipzig, (Prof. U. G. Froster)
- 10/2002 – 10/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Biologie-Student), Institut für Virologie, Universität Leipzig (Prof. U. G. Liebert)
Projektarbeit: *‘Lokalisations- und Expressionsanalysen von N-Glykosylierungsmutanten des Rötelnvirus-E1-Proteins’*
- 08/1999 – 03/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Biologie-Student), Umweltforschungszentrum Leipzig – Halle GmbH, Department Umweltmikrobiologie, Universität Leipzig (Prof. W. Babel)
- 08/1999 – 04/2003 Mitarbeiter in der Routinediagnostik (Biologie-Student), BioCheck GmbH, Veterinär diagnostisches Labor, Leipzig (Dr. A. Lindner)

Wissenschaftliche Publikationen

Stolz C., Heß G., Hähnel P.S., Grabellus F., Hoffarth S., Schmidt K.W., Schuler M. (2008). Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to Rituximab-induced apoptosis. *Blood*. 112(8):3312-21.

Augsten M., Sundquist C., Olsson E., Stolz C., Tsagozis P., Levchenko T., Frederick M.J., Borg A., Egevad L., Micke P., Östman A. (2008). CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *PNAS*. 106(9):3414-9.

Übersichtsartikel (Reviews)

Stolz C. und Schuler M. (2009). Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. *Leukemia & Lymphoma*. Manuskript.

Stolz C. und Schuler M. (2007). Entwicklung und Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper in der Onkologie. *Onkologie heute* 5, 12-15.

Tagungsbeiträge

Stolz C., Heß G., Hähnel P.S., Grabellus F., Hoffarth S., Schmidt K.W., Schuler M. (2008). Apoptosis resistance mechanisms to antibody based therapies in B-cell lymphoma. Poster, 6th EWCD.

Stolz C., Heß G., Hähnel P.S., Grabellus F., Hoffarth S., Schmidt K.W., Schuler M. (2008). Identification and validation of resistance mechanisms to Rituximab-based therapies in B-cell lymphoma. Poster, CIMT.

Stolz C., Heß G., Hähnel P., Hoffarth S., Hohberger A., Huber C., Schuler M. (2007). Functional identification of resistance mechanisms to antibody-based therapies in B-cell lymphoma. Poster, 3rd Spring School on Immunology.

Stolz C., Heß G., Hähnel P., Hoffarth S., Hohberger A., Huber C., Schuler M. (2006). Molecular dissection of antibody-induced cell death in malignant B cells. Poster, 5th EWCD.

Micke P., Ohshima M., Sundquist C., Augsten M., Stolz C., Kappert K., Östman A. (2005). In situ gene expression profiling of cancer-associated fibroblasts. *Clinical Cancer Research*. 11(24):9000S.

Sundquist C., Augsten M., Stolz C., Micke P., Östman A. (2005). Identification of novel cancer drug targets in cancer-associated fibroblasts. Poster, 4th KICancer Retreat.

Stolz C., Harms H., Breuer U. (2005). Localization of PHB-Biosynthesis in Recombinant Yeasts. Poster, 3rd Biotechnology day.

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Identifikation und Modulation von Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Claudia Stolz* befürworte.

Essen, den _____
Prof. Dr. Martin Schuler

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Claudia Stolz

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Claudia Stolz